

536,768

10/536768

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年6月24日 (24.06.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/052829 A1

(51) 国際特許分類⁷: C07C 67/36, 69/716, C07D 317/60, C12P 41/00 // C07M 7:00

(52) 国際出願番号: PCT/JP2003/015644

(53) 国際出願日: 2003年12月8日 (08.12.2003)

(54) 国際出願の言語: 日本語

(55) 国際公開の言語: 日本語

(56) 優先権データ:
特願2002-355305 2002年12月6日 (06.12.2002) JP
特願2003-133456 2003年5月12日 (12.05.2003) JP

(57) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 鐘淵化学工業株式会社 (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒530-8288 大阪府 大阪市 北区中之島3丁目2番4号 Osaka (JP).

(58) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 田岡 直明 (TAOKA,Naoaki) [JP/JP]; 〒676-8688 兵庫県 高砂市 高砂町宮前町1-8 鐘淵化学工業株式会社高砂工業所内 Hyogo (JP). 森山 大輔 (MORIYAMA,Daisuke) [JP/JP]; 〒676-8688 兵庫県 高砂市 高砂町宮前町1-8 鐘淵化学工業株式会社高砂工業所内 Hyogo (JP). 森 耕平 (MORI,Kohei) [JP/JP]; 〒676-8688 兵庫県 高砂市 高砂町宮前町1-8 鐘淵化学工業株式会社高砂工業所内 Hyogo (JP). 大石 孝洋 (OISHI,Takahiro) [JP/JP];

(76) 代理人: 安富 康男, 外 (YASUTOMI,Yasuo et al.); 〒532-0011 大阪府 大阪市 淀川区西中島5丁目4番20号 中央ビル Osaka (JP).

(77) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(78) 指定国(広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING OPTICALLY ACTIVE 3-HYDROXYPROPIONIC ESTER DERIVATIVE

(54) 発明の名称: 光学活性3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体の製造法

WO 2004/052829 A1

(57) Abstract: A process for easily producing from an inexpensive material an optically active 3-hydroxypropionic ester derivative useful as an intermediate for medicines. The process, which is for producing an optically active 3-hydroxypropionic ester derivative, comprises reacting an inexpensively available acetic ester derivative with a base and a formic ester to convert the acetic ester derivative into a 2-formylacetic ester derivative and stereoselectively reducing the formyl group of the derivative with an enzyme source having the ability to stereoselectively reduce the formyl group of the derivative.

(57) 要約: 本発明は、医薬品中間体として有用な光学活性3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体を安価な原料から簡便に製造できる方法を提供する。つまり、本発明は、安価に入手可能な酢酸エステル誘導体と塩基及び蟻酸エステルとを反応させて、2-ホルミル酢酸エステル誘導体に変換した後、前記誘導体のホルミル基を立体選択的に還元する能力を有する酵素源を用いて、前記誘導体のホルミル基を立体選択的に還元することにより、光学活性3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体を製造する方法である。

明細書

光学活性3-ヒドロキシプロピオニ酸エステル誘導体の製造法

技術分野

5 本発明は、医薬品中間体として有用な光学活性3-ヒドロキシプロピオニ酸エステル誘導体、とりわけ光学活性2-(ヒドロキシメチル)-3-フェニルプロピオニ酸エステル誘導体の製法に関する。

より詳細には、安価に入手可能な酢酸エステル誘導体、蟻酸エステル及び塩基を用いて2-ホルミル酢酸エステル誘導体を合成し、当該2-ホルミル酢酸エス10 テル誘導体を、そのホルミル基を立体選択的に還元する能力を有する酵素源を用いて立体選択的に還元することを特徴とする、光学活性3-ヒドロキシプロピオニ酸エステル誘導体、とりわけ光学活性2-(ヒドロキシメチル)-3-フェニルプロピオニ酸エステル誘導体の製法に関する。

15 背景技術

従来、光学活性3-ヒドロキシプロピオニ酸エステル誘導体の製造法としては、以下の様な方法が知られている。

1) 2-置換-1, 3-プロパンジオールを微生物を用いて不斉酸化することにより、光学活性2-置換-3-ヒドロキシプロピオニ酸を得る方法 (Chem. 20 Lett., 1979, Vol. 11, 1379-1380)。

2) 0.1%濃度の2-ホルミル酢酸エステル誘導体をキャンディダ属、ロドトルラ属、トルロプシス属等に属する微生物を用いて還元することにより、光学活性3-ヒドロキシプロピオニ酸エステル誘導体を得る方法 (特開昭60-199389号公報)。

25 しかしながら、1) の方法では、基質として用いるジオール化合物が高価であり、また、2位置換基がメチル基以外の場合では立体選択性も低い。また、2) の方法では、使用基質が微生物、酵素の還元活性に悪影響を与えることから、仕込濃度が極めて低い等、いずれも工業的製法としては大きな課題を有している。

一方、2-ホルミル酢酸エステル誘導体の製造法としては、以下の様な方法が

知られている。

3) 2-メチル-1, 3-ジオキソラン-2-プロピオン酸エチルをNaH及び

蟻酸エチルを用いてホルミル化した後、蒸留精製することにより、 α - (ホルミ

ル) - 2-メチル-1, 3-ジオキソラン-2-プロピオン酸エチルを得る方法

5 (Phosphorus and Sulfur, 1986, Vol. 28, 3
30-345)。

4) フェニルプロピオン酸エチルを金属ナトリウム及び蟻酸エチルを用いてホル

ミル化することにより、粗2-ホルミルフェニルプロピオン酸エチルを得る方法

(Eur. J. Med. Chem., 1988, Vol. 23, 53-62)。

10 しかしながら、いずれの方法においても反応生成物は未反応原料あるいはNaH由来の鉱油等の不純物を多く含有しており、高純度の生成物を得るには、蒸留、晶析またはカラム等の精製工程を必要とする等、工業的製法としては改善すべき課題を有している。

15 発明の要約

上記現状に鑑み、本発明の目的は、医薬品の中間体として有用な光学活性3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体、中でも光学活性2- (ヒドロキシメチル) - 3-フェニルプロピオン酸エステル誘導体を安価で入手容易な原料から簡便に製造することにある。

20 本発明者等は上記課題につき鋭意検討を行った結果、安価に入手可能な酢酸エステル誘導体から、簡便な方法にて高純度の2-ホルミル酢酸エステル誘導体を合成し、該2-ホルミル酢酸エステル誘導体を、そのホルミル基を立体選択的に還元する能力を有する酵素源を用いて立体選択的に還元することにより、光学活性3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体を簡便に製造する方法を見出し、

25 本発明を完成するに至った。

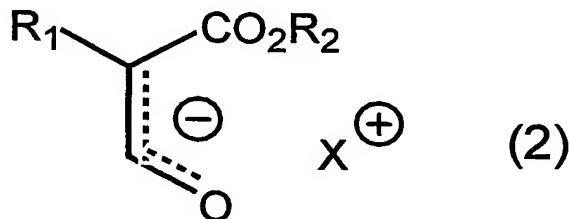
即ち、本発明は、一般式(1)；



(式中、R₁は炭素数2~10のアルキル基、置換基を有していても良い炭素数

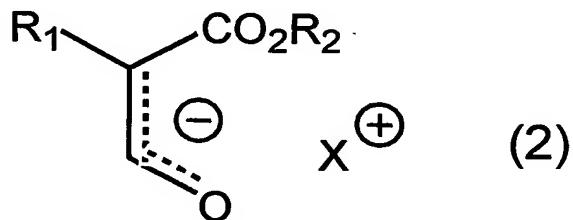
5 ～ 15 のアラルキル基、又は置換基を有していても良い炭素数 5 ～ 15 のアリール基を表す。R₂ は炭素数 1 ～ 10 のアルキル基、又は置換基を有していても良い炭素数 5 ～ 15 のアラルキル基を表す。) で表される酢酸エステル誘導体を、
塩基及び蟻酸エステルと反応させることにより、一般式 (2) ;

5



10 (式中、R₁ 及び R₂ は前記と同じ。X は H、Li、Na、又は K を表す。) で表される 2-ホルミル酢酸エステル誘導体に変換する工程、及び、有機溶媒と水を用いて、不純物を有機層に除去しつつ、前記式 (2) で表される誘導体を水層に転溶する工程からなることを特徴とする、前記式 (2) で表される 2-ホルミル酢酸エステル誘導体の製造法を提供する。

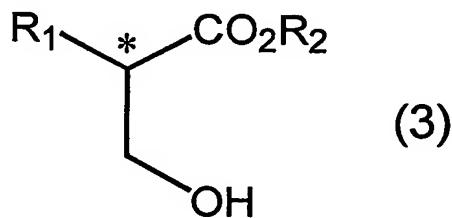
15 また、本発明は、一般式 (2) ;



20

(式中、R₁、R₂ 及び X は前記と同じ基を表す。) で表される 2-ホルミル酢酸エステル誘導体を、そのホルミル基を立体選択的に還元する能力を有する酵素源を用いて立体選択的に還元することを特徴とする、一般式 (3) ;

25

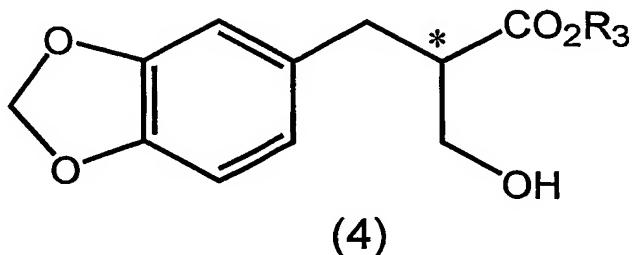


(式中、R₁ 及び R₂ は前記と同じ、* は不斉炭素原子を表す。) で表される光

光学活性 3-ヒドロキシプロピオニ酸エステル誘導体の製造法を提供する。

また、本発明は、一般式 (4)；

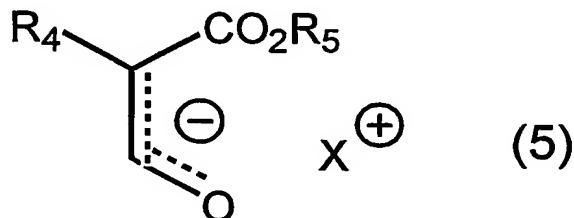
5



(式中、R₃は炭素数 1～10 のアルキル基を表し、*は不斉炭素原子を表す。) で表される光学活性 2-(ヒドロキシメチル)-3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオニ酸エステル誘導体を提供する。

また、本発明は、一般式 (5)；

15



(式中、R₄は炭素数 2～6 のアルキル基を表す。R₅は炭素数 1～10 のアルキル基を表す。XはH、Li、Na、又はKを表す。) で表される 2-ホルミル酢酸エステル誘導体を提供する。

20

発明の詳細な開示

以下に本発明を詳細に説明する。

まず、本発明に関わる化合物について説明する。前記式 (1)、(2) 及び (3)において、R₁は、炭素数 2～10 のアルキル基、置換基を有していても良い炭素数 5～15 のアラルキル基、又は置換基を有していても良い炭素数 5～15 のアリール基である。

例えば、炭素数 2～10 のアルキル基としては、エチル基、n-プロピル基、isopropyl 基、n-ブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、n-ペンチル基、ヘキシル基等が挙げられる。

置換基を有していても良い炭素数5～15のアラルキル基及び置換基を有していても良い炭素数5～15のアリール基の置換基としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子等のハロゲン原子；メチル基、エチル基等の炭素数1～10のアルキル基；メトキシ基、エトキシ基等の炭素数1～10のアルコキシ基；ニトロ基、シアノ基、メチレンジオキシ基等が挙げられる。なお、上記アラルキル基及びアリール基の炭素数は、当該置換基の炭素数は含まず、アラルキル基及びアリール基のみの炭素数を意味する。

置換基を有していても良い炭素数5～15のアラルキル基としては、ベンジル基、o-クロロベンジル基、m-ブロモベンジル基、p-フルオロベンジル基、p-ニトロベンジル基、p-シアノベンジル基、m-メトキシベンジル基、3,4-メチレンジオキシベンジル基、フェネチル基、ナフチルメチル基、ピリジルメチル基等が挙げられる。

置換基を有していても良い炭素数5～15のアリール基としては、フェニル基、o-クロロフェニル基、m-ブロモフェニル基、p-フルオロフェニル基、p-ニトロフェニル基、p-シアノフェニル基、m-メトキシフェニル基、ナフチル基、ピリジル基、インドリル基等が挙げられる。

上記のなかでもR₁として好ましくは、炭素数2～10のアルキル基、置換基を有していても良い炭素数5～15のアラルキル基である。炭素数2～10のアルキル基として好ましくは、n-プロピル基、n-ブチル基、n-ペンチル基であり、より好ましくはn-ブチル基である。置換基を有していても良い炭素数5～15のアラルキル基として好ましくは、ベンジル基、3,4-メチレンジオキシベンジル基であり、より好ましくは3,4-メチレンジオキシベンジル基である。

また、前記式(1)、(2)及び(3)において、R₂は、炭素数1～10のアルキル基、または置換基を有していても良い炭素数5～15のアラルキル基である。R₂としての置換基を有していても良い炭素数5～15のアラルキル基の置換基としては、R₁のアラルキル基の置換基として例示したものと同じもの等が挙げられる。上記R₂のアラルキル基の炭素数には、置換基の炭素数を含まないものである。

例えば、炭素数1～10のアルキル基としては、メチル基、エチル基、n-ブロピル基、i s o-プロピル基、n-ブチル基、s e c-ブチル基、t e r t-ブチル基、n-ペンチル基、ヘキシル基等が挙げられる。好ましくは、メチル基、エチル基、t e r t-ブチル基である。

5 置換基を有していても良い炭素数5～15のアラルキル基としては、ベンジル基、o-クロロベンジル基、m-ブロモベンジル基、p-フルオロベンジル基、p-ニトロベンジル基、p-シアノベンジル基、m-メトキシベンジル基、3,4-メチレンジオキシベンジル基、フェネチル基、ナフチルメチル基、ピリジルメチル基等が挙げられる。好ましくは、ベンジル基である。

10 上記のなかでもR₂として好ましくは、炭素数1～10のアルキル基であり、より好ましくは、メチル基、エチル基である。

また、前記式(4)において、R₃は炭素数1～10のアルキル基である。炭素数1～10のアルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、n-ブロピル基、i s o-プロピル基、n-ブチル基、s e c-ブチル基、t e r t-ブチ15ル基、n-ペンチル基、ヘキシル基等が挙げられる。

また、前記式(3)及び(4)において、*は不斉炭素原子を表す。

また、前記式(5)において、R₄は炭素数2～6のアルキル基である。炭素数2～6のアルキル基としては、例えば、エチル基、n-ブロピル基、i s o-プロピル基、n-ブチル基、s e c-ブチル基、t e r t-ブチル基、n-ペンチル基、ヘキシル基等が挙げられる。好ましくはn-ブロピル基、n-ブチル基、n-ペンチル基であり、更に好ましくはn-ブチル基である。

また、前記式(5)において、R₅は炭素数1～10のアルキル基である。炭素数1～10のアルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、n-ブロピル基、i s o-プロピル基、n-ブチル基、s e c-ブチル基、t e r t-ブチ25ル基、n-ペンチル基、ヘキシル基等が挙げられる。好ましくは、エチル基である。

また、前記式(2)及び(5)において、XはH、L i、N a、又はKである。好ましくは、N aである。

なお、前記式(4)で表される光学活性2-(ヒドロキシメチル)-3-(3,

4-メチレンジオキシフェニル) -プロピオン酸エステル誘導体及び前記式(5)で表される2-ホルミル酢酸エステル誘導体は、文献に未記載の新規化合物である。

次に、本発明における前記式(2)で表される2-ホルミル酢酸エステル誘導体の製造法について説明する。

まず、上記のR₁及びR₂を有する誘導体(1)は、工業的に入手可能、あるいは工業的に入手可能な原料から容易に合成することができる。例えば、3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオン酸エチルは、3,4-メチレンジオキシ桂皮酸を水素化した後、エチルエステル化することにより容易に調製することができる。

前記式(1)で表される酢酸エステル誘導体を、適当な溶媒中にて塩基及び蟻酸エステルと反応させることにより、前記式(2)で表される2-ホルミル酢酸エステル誘導体を製造することができる。

上記塩基としては、ナトリウムハイドライド(NaH)；リチウムハイドライド(LiH)；金属ナトリウム(Na)；ナトリウムメトキサイド(MeONa)、ナトリウムエトキサイド(EtONa)、ナトリウムイソプロポキサイド(iPrONa)、カリウムtert-ブトキサイド(tBuOK)等のアルカリ金属アルコキサイド等が挙げられる。好ましくは、ナトリウムハイドライド、金属ナトリウム、アルカリ金属アルコキサイドが挙げられ、より好ましくは、ナトリウムハイドライド(NaH)が挙げられる。

塩基の使用量は、酢酸エステル誘導体(1)と塩基のモル比(酢酸エステル誘導体(1)：塩基)として、好ましくは1:1～1:15、より好ましくは1:1～1:5、更に好ましくは1:1～1:3である。

上記蟻酸エステルとしては、例えば、蟻酸メチル、蟻酸エチル、蟻酸n-プロピル、蟻酸iso-プロピル、蟻酸n-ブチル、蟻酸iso-ブチル、蟻酸tert-ブチル等が挙げられる。好ましくは、蟻酸メチル、蟻酸エチルである。なお、本反応においては、塩基性条件下、蟻酸エステル由来のアルコールが副生する為、前記酢酸エステル誘導体(1)は副生したアルコールによりエステル交換され易い。そこで、前記酢酸エステル誘導体(1)と蟻酸エステルのエステル基

は同一基であることが望ましい。

蟻酸エステルの使用量は、酢酸エステル誘導体（1）と蟻酸エステルのモル比（酢酸エステル誘導体（1）：蟻酸エステル）として好ましくは1：1～1：30、より好ましくは1：1～1：10、更に好ましくは1：1～1：5である。

5 本反応に使用できる溶媒としては、例えば、ヘキサン、ヘプタン、ベンゼン、トルエン等の炭化水素系溶媒；ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1, 4-ジオキサン、*tert*-ブチルメチルエーテル、ジメトキシエタン等のエーテル系溶媒；塩化メチレン、クロロホルム、1, 1, 1-トリクロロエタン等のハロゲン系溶媒；ジメチルホルムアミド、アセトアミド、ホルムアミド、アセトニトリル、プロピオニトリル等の含窒素系溶媒；ジメチルスルホキシド、N-メチルピロリドン、ヘキサメチルリン酸トリアミド等の非プロトン性極性溶媒；メタノール、エタノール、*n*-プロパノール、*n*-ブタノール等のアルコール系溶媒等が挙げられる。上記溶媒は単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

10 本反応の反応温度としては、好ましくは-20～60℃、より好ましくは0～

15 50℃である。

本反応の反応時間としては、好ましくは1時間～72時間、より好ましくは1時間～20時間である。

上記反応を行うに際し、各試剤の混合方法は特に限定されないが、工業的規模で反応を安全に制御して行う上では、塩基と溶媒の混合物に、酢酸エステル誘導体および蟻酸エステルを同時に添加する方法が好ましい。この方法では、加えた酢酸エステル誘導体が逐次反応するため、添加速度を調節することによって反応を安全に制御することができる。ここで、工業的規模とは、反応で用いる塩基使用量として、通常1kg以上であり、好ましくは10kg以上、より好ましくは100kg以上、さらに好ましくは1000kg以上、特に好ましくは10000kg以上の塩基を反応に供することを意味する。

酢酸エステル誘導体および蟻酸エステルの添加時間は、反応の規模にもよるが、1時間以上とすることが好ましく、より好ましくは3時間以上、さらに好ましくは5時間以上である。また、添加時間は、72時間以下とすることが好ましい。

また、この方法にて反応をより安全に行う上では、塩基濃度を高めることが好

ましく、その際の塩基と溶媒の混合物における塩基濃度としては一概には云えないが、通常 10 重量%以上、好ましくは 20 重量%以上、より好ましくは 30 重量%以上であり、とりわけ 40 重量%以上として反応を行うことも好適である。

更に、上記反応方法に於いては、反応温度を高めて、添加した基質をより短時間で反応させて、反応を安全に制御することが好ましい。この場合の反応温度としては一概には云えないが、通常、20 °C以上であり、好ましくは 30 °C以上、より好ましくは 40 °C以上であり、また反応液の沸点まで反応温度を高めてもよい。

上記方法にて反応を行う場合、塩基濃度が 10 重量%以上、および反応温度が 20 °C以上の条件で行なうことが特に好ましい。

尚、反応の進行と共に反応液の流動性が低下する場合には、適正な攪拌状態を維持して反応を円滑に行なう上で、反応の進行に応じて溶媒を添加すれば良く、簡便には酢酸エステル誘導体と蟻酸エステルの混合物を溶媒に溶解した溶液として加えれば良い。

反応終了後、反応液中に含まれる前記式 (2) で表される 2-ホルミル酢酸エステル誘導体は、その製造過程における各種分解や副反応、また原料等が残存することにより多量の不純物、例えば、未反応の酢酸エステル誘導体、蟻酸エステル、鉱油等の塩基由来の不純物等を多数含む。高純度の目的物を得るために、これらの不純物を除去する必要がある。

本発明者らは銳意検討の結果、2-ホルミル酢酸エステル誘導体 (2) 及び不純物を含有する反応液を水と接触させることで、2-ホルミル酢酸エステル誘導体のアルカリ金属塩を水層に、不純物を有機層に選択的に分配できることを見いだし、得られた水層を酸を用いて酸性化した後、水層に含まれる 2-ホルミル酢酸エステル誘導体 (2) を有機溶媒で抽出、濃縮することにより、これら不純物を有機層に簡便に除去し、高純度の目的物を効率よく取得できる方法を開発するに至った。

以下に、前記式 (2) で表される 2-ホルミル酢酸エステル誘導体の単離精製操作について説明する。前記式 (2) で表される 2-ホルミル酢酸エステル誘導体に含まれる不純物を除去する為には、2-ホルミル酢酸エステル誘導体 (2)

及び不純物を含有する反応液に水を添加して、2-ホルミル酢酸エステル誘導体(2)のアルカリ金属塩を水層に選択的に転溶する。この場合、目的物である2-ホルミル酢酸エステル誘導体(2)をほとんどロスすることなく、未反応の酢酸エステル誘導体等の不純物を反応溶媒等の有機層に除去することができる。

5 水の添加に先立ち、予め反応液を濃縮減量しても良く、また、反応液に一般的な抽出溶媒、例えば、酢酸エチル、トルエン、ヘキサン、メチルエチルケトン、*tert*-ブチルメチルエーテル、ジエチルエーテル、塩化メチレン等を添加しても良い。また、2-ホルミル酢酸エステル誘導体(2)のアルカリ金属塩を水層に転溶した後、水層を上記一般的な抽出溶媒を用いて再洗浄することにより、不純物をさらに低減することも可能である。

10 次いで、上記の高純度の2-ホルミル酢酸エステル誘導体(2)を含有する水層を、一般的な酸、例えば、塩酸、硫酸等の無機酸、酢酸、クエン酸等の有機酸等を用いて、好ましくはpH5以下、より好ましくはpH3以下に調整した後、上記一般的な抽出溶媒を用いて2-ホルミル酢酸エステル誘導体(2)を抽出した後、これを濃縮することにより化学純度の高い目的物を効率よく取得することができる。

15 上記純度は、好ましくは90重量%以上であり、より好ましくは94重量%以上である。

一方、反応液に水を添加する上記転溶操作なしに、反応液に酸を加えて抽出する場合、目的物である2-ホルミル酢酸エステル誘導体及び未反応の酢酸エステル誘導体等の不純物は、ともに反応溶媒等の有機層に抽出される為、高純度の目的物を得ることができない。

次に、本発明における前記式(3)で表される光学活性3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体の製造法について説明する。

25 前記式(2)で表される2-ホルミル酢酸エステル誘導体のホルミル基を立体選択的に還元する活性を有する酵素源の存在下、前記式(2)のホルミル基を立体選択的に還元することにより、前記式(3)で表される光学活性3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体を製造することができる。

ここで、「酵素源」とは、上記還元活性を有する酵素自体はもちろんのこと、

上記還元活性を有する微生物の培養物およびその処理物も含まれる。「微生物の培養物」とは、菌体を含む培養液あるいは培養菌体を意味する。「その処理物」としては、例えば、粗抽出液、凍結乾燥微生物体、アセトン乾燥微生物体、それら菌体の磨碎物等を意味する。さらにそれらは、酵素自体あるいは菌体のまま公
5 知の手段で固定化して用いることができる。固定化は、当業者に周知の方法（例えば架橋法、物理的吸着法、包括法等）で行うことができる。

本発明の酵素還元工程において、前記式（2）で表される誘導体のホルミル基を立体選択的に還元する活性を有する酵素源としては、ブレタノマイセス（Brettanomyces）属、キャンディダ（Candida）属、クリプトコッカス（Cryptococcus）属、デバリオマイセス（Debaryomyces）属、ガラクトマイセス（Galactomyces）属、オガタエア（Ogataea）属、ピキア（Pichia）属、ロドトルラ（Rhodotorula）属、サッカロマイコプシス（Saccharomyopsis）属、スオリディオボラス（Sporidiobolus）属、スプロボロマイセス（Sporobolomyces）属、ステリグマトマイセス（Sterigmatomyces）属、トルラスピラ（Torulaspora）属、トリコスプロロン（Trichosporon）属、ヤマダジーマ（Yamadazyma）属、アクロモバクター（Achromobacter）属、セルロモナス（Cellulomonas）属、デボシア（Devosia）属、ハフニア（Hafnia）属、ジェンセニア（Jensenia）属、クレブシエラ（Klebsiella）属、プロテウス（Proteus）属、ロドコッカス（Rhodococcus）属、セラチア（Serratia）属、シストフィロバシディウム（Cystofilobasidium）属、ウィリオプシス（Williopsis）属、ヤロビア（Yarrowia）属、ミクロバクテリウム（Microbacterium）属、及びミクロコッカス（Micrococcus）属からなる群から選ばれた微生物由來の酵素源が挙げられる。

上記酵素源のうち、前記式（2）で表される誘導体のホルミル基をR選択的に還元する活性を有する酵素源としては、ブレタノマイセス（Brettanomyces）属、キャンディダ（Candida）属、クリプトコッカス（Cryptococcus）属、デバリオマイセス（Debaryomyces）属、ガラクトマイセス（Galactomyces）属、オガタエア（Ogataea）属、ピキア（Pichia）属、ロドトルラ（Rhodotorula）属、サッカロマイコプシス（Saccharomyopsis）属、スオリディオボラス（Sporidiobolus）属、スプロボロマイセス（Sporobolomyces）属、ステリグマトマイセス（Sterigmatom

ycles) 属、トルラスpora (Torulaspora) 属、トリコスpora (Trichosporon) 属、ヤマダジーマ (Yamadazyma) 属、アクロモバクター (Achromobacter) 属、セルロモナス (Cellulomonas) 属、デボシア (Devsia) 属、ハフニア (Hafnia) 属、ジエンセニア (Jensenia) 属、クレブシエラ (Klebsiella) 属、ミクロコッカス (5 *Micrococcus*) 属、プロテウス (Proteus) 属、ロドコッカス (Rhodococcus) 属、及びセラチア (Serratia) 属からなる群から選ばれた微生物由来の酵素源が好ましい。

上記酵素源のうち、前記式 (2) で表される誘導体のホルミル基をR選択的に還元する活性を有する酵素源としては、ブレタノマイセス・アノマラス (*Brettanomyces anomalus*) 、キヤンディダ・カンタレリ (*Candida cantarellii*) 、キヤンディダ・グラエボーサ (*Candida glaebosa*) 、キヤンディダ・グロペンギッセリイ (*Candida gropengiesseri*) 、キヤンディダ・ラクチスココンデンシイ (*Candida lactis-condensi*) 、キヤンディダ・マグノリエ (*Candida magnoriae*) 、キヤンディダ・マルトーサ (*Candida maltosa*) 、キヤンディダ・マリス (*Candida mari*) 、キヤンディダ・モギイ (*Candida mogii*) 、キヤンディダ・ピニ (*Candida pini*) 、キヤンディダ・ルゴーサ (*Candida rugosa*) 、キヤンディダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*) 、キヤンディダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*) 、キヤンディダ・バーサチリス (*Candida versatilis*) 、クリプトコッカス・クルバタス (*Cryptococcus curvatus*) 、クリプトコッカス・テレウス (*Cryptococcus terraeus*) 、デバリオマイセス・ネパレンシス (*Debaryomyces nepalensis*) 、デバリオマイセス・ロベルトシエ (*Debaryomyces robertsiae*) 、ガラクトマイセス・レースシイ (*Galactomyces reessii*) 、オガタエア・ミヌータ バー. ミヌータ (*Ogataea minuta var. minuta*) 、ピキア・カナデンシス (*Pichia canadensis*) 、ピキア・シルビコラ (*Pichia silvicola*) 、ピキア・キシローサ (*Pichia xylosa*) 、ロドトルラ・アウランチアカ (*Rhodotorula aurantiaca*) 、ロドトルラ・グルチニス (*Rhodotorula glutinis*) 、ロドトルラ・グラミニス (*Rhodotorula graminis*) 、ロドトルラ・ラクトーサ (*Rhodotorula lactosa*) 、サッカロマイコプシス・セレノスpora (*Saccharomyces selenospora*) 、スオリディオボラス・ジョンソニイ (*Sporidiobolus johnsonii*) 、スオリディオボラス・サルモニコラ (*Sporidiobolus s*

almonicolor)、スポロボロマイセス・サルモニコラ (Sporobolomyces salmonicolor)、ステリグマトマイセス・ハロフィラス (Sterigmatomyces halophilus)、トルラスボラ・デルブレッキイ (Torulaspora delbrueckii)、トリコスボロン・アステロイデス (Trichosporon asterooides)、ヤマダジーマ・スチピチス (Yamadazyma stipitis)、アクロモバクター・キシロキダンス サブスピーシーズ デニトリフィカنس (Achromobacter xylosoxidans subsp. denitrificans)、セルロモナス・フィミ (Cellulomonas fimi)、セルロモナス・スピーシーズ (Cellulomonas sp.)、セルロモナス・ウダ (Cellulomonas uda)、デボシア・リボフラビナ (Deboscia riboflavina)、ハフニア・アルベイ (Hafnia alvei)、ジェンセニア・カニクルリア (Jensenia canicuria)、クレブシエラ・プランチコラ (Klebsiella planticola)、ミクロコッカス・ルテウス (Micrococcus luteus)、プロテウス・インコンスタンス (Proteus constans)、ロドコッカス・エリスロポリス (Rhodococcus erythropolis)、ロドコッカス・エクイ (Rhodococcus equi)、ロドコッカス・スピーシーズ (Rhodococcus sp.)、セラチア・マルセッセンス (Serratia marcescens) 等の微生物由来の酵素源が好ましい。

また、前記式(2)で表される誘導体のホルミル基をS選択的に還元する活性を有する酵素源としては、キャンディダ (Candida) 属、シストフィロバシディウム (Cystofilobasidium) 属、ピキア (Pichia) 属、ロドトルラ (Rhodotorula) 属、トルラスボラ (Torulaspora) 属、ウィリオプシス (Williopsis) 属、ヤロビア (Yarrowia) 属、デボシア (Deboscia) 属、ミクロバクテリウム (Microbacterium) 属、及びミクロコッカス (Micrococcus) 属からなる群から選ばれた微生物由来の酵素源が好ましい。

また、前記式(2)で表される誘導体のホルミル基をS選択的に還元する活性を有する酵素源としては、キャンディダ・マグノリエ (Candida magnoliae)、シストフィロバシディウム・ビスポリディ (Cystofilobasidium bisporidii)、ピキア・ビスピーラ (Pichia bispora)、ロドトルラ・グルチニス バー。 グルチニス (Rhodotorula glutinis var. glutinis)、トルラスボラ・グロボーサ (Torulaspora globosa)、ウィリオプシス・サツルヌス バー。 マラキイ (Williopsis saturnus var. mrakii)、ウィリオプシス・サツルヌス バー。 サツルヌス (Willi

opsis saturnus var. saturnus)、ヤロビア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica)、デボシア・リボフラビナ (Devosia riboflavina)、ミクロバクテリウム・エステラロマチカム (Microbacterium esteraromaticum)、ミクロコッカス・ルテウス (Micrococcus luteus) 等の微生物由来の酵素源が好ましい。

5 また、上記微生物由来の還元酵素の產生能を有する微生物としては、野生株または変異株のいずれでもよい。あるいは細胞融合、遺伝子操作等の遺伝学的手法により誘導される微生物も用いることができる。本酵素を生産する遺伝子操作された微生物は、例えば、これらの酵素を単離及び／または精製して酵素のアミノ酸配列の一部または全部を決定する工程、このアミノ酸配列に基づいて酵素をコードするDNA配列を得る工程、このDNAを他の微生物に導入して組換え微生物を得る工程、及びこの組換え微生物を培養して、本酵素を得る工程を含有する方法により得ることができる (WO 98/35025号パンフレット)。

10 酵素源として用いる微生物の為の培養培地は、その微生物が増殖し得るものである限り特に限定されない。例えば、下記栄養源を含有する通常の液体培地を用することができる。例えば、炭素源として、グルコース、シュークロース等の糖質；エタノール、グリセロール等のアルコール類；オレイン酸、ステアリン酸等の脂肪酸及びそのエステル類；菜種油、大豆油等の油類等が挙げられる。

15 窒素源として、硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、磷酸1水素アンモニウム、ペプトン、カザミノ酸、コーンスティープリカー、ふすま、酵母エキスなどが挙げられる。

20 無機塩類として、硫酸マグネシウム、硫酸亜鉛、硫酸鉄、硫酸銅、硫酸マンガン等の硫酸塩；塩化ナトリウム、炭酸カルシウム、磷酸1水素カリウム、磷酸2水素カリウムなどが挙げられる。

他の栄養源として、麦芽エキス、肉エキス等を使用することができる。

25 培養は好気的に行い、通常、培養時間は1～5日間程度、培地のpHが3～9、培養温度は10～50℃で行うことができる。

本発明の還元反応は、適当な溶媒中に基質の2-ホルミル酢酸エステル誘導体(2)、補酵素NAD(P)H及び上記微生物の培養物またはその処理物等を添加し、pH調整下攪拌することにより行うことができる。

還元反応に用いる溶媒としては、酢酸エチル、酢酸ブチル、トルエン、ヘキサン等を添加してもよい。

反応条件は、用いる酵素、微生物またはその処理物、基質濃度等によって異なるが、通常、基質濃度は約0.1～100重量%、好ましくは1～60重量%である。

補酵素NAD (P) Hの濃度は、基質に対して、通常、0.0001～100モル%、好ましくは0.0001～0.1モル%である。

反応温度は、通常、10～60°C、好ましくは20～50°Cである。

反応のpHは、通常、4～9、好ましくは5～8である。

反応時間は、通常、1～120時間、好ましくは1～72時間である。

上記反応は、基質を一括、または連続的に添加して行うことができる。また、反応はバッチ方式または連続方式で行うことができる。

本発明の還元工程において、一般に用いられる補酵素NAD (P) H再生系を組み合わせて用いることにより、高価な補酵素の使用量を大幅に減少させることができる。代表的なNAD (P) H再生系としては、例えば、グルコース脱水素酵素及びグルコースを用いる方法が挙げられる。

還元酵素遺伝子及びこの酵素が依存する補酵素を再生する能力を有する酵素（例えばグルコース脱水素酵素）の遺伝子を同一宿主微生物内に導入した形質転換微生物の培養物またはその処理物等を用いて、上記と同様の還元反応を行えば、別途に補酵素の再生に必要な酵素源を調整する必要がないため、より低コストで光学活性3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体を製造することができる。

上記のような形質転換微生物としては、上記還元酵素をコードするDNA及び該酵素が依存する補酵素を再生する能力を有する酵素をコードするDNAを有するプラスミドで形質転換された形質転換微生物が挙げられる。ここで、酵素を再生する能力を有する酵素としては、グルコース脱水素酵素が好ましく、バシラス・メガテリウム (Bacillus megaterium) 由来のグルコース脱水素酵素がより好ましい。また、宿主微生物としては大腸菌 (Escherichia coli) が好ましい。

より好ましくは、キャンディダ・マグノリエ (Candida magnoliae) IFO 0705由来の還元酵素遺伝子及びバシラス・メガテリウム (Bacillus megaterium

) 由来のグルコース脱水素酵素遺伝子で形質転換された Escherichia coli HB101(pNTCRG) (受託番号: F E R M B P - 6 8 9 8、受託日: 平成 11 年 9 月 28 日)、

デボシア・リボフラビナ (Devosia riboflavina) I F O 1 3 5 8 4 由来の還元酵素遺伝子及びバシラス・メガテリウム (Bacillus megaterium) 由来のグルコース脱水素酵素遺伝子で形質転換された Escherichia coli HB101(pNTDRG1) (受託番号: F E R M B P - 0 8 4 5 8、受託日: 平成 15 年 8 月 25 日)、

ロドトルラ・グルチニス (Rhodotorula glutinis) I F O 0 4 1 5 由来の還元酵素遺伝子及びバシラス・メガテリウム (Bacillus megaterium) 由来のグルコース脱水素酵素遺伝子で形質転換された Escherichia coli HB101(pNTRGG1) (受託番号: F E R M B P - 7 8 5 8、受託日: 平成 14 年 1 月 22 日)、

セラチア・マルセッセンス (Serratia marcescens) I F O 1 2 4 6 8 由来の還元酵素遺伝子及びバシラス・メガテリウム (Bacillus megaterium) 由来のグルコース脱水素酵素遺伝子で形質転換された Escherichia coli HB101(pNTSGG1) (受託番号: F E R M P - 1 8 4 4 9、受託日: 平成 13 年 8 月 6 日)、

ミクロコッカス・ルテウス (Micrococcus luteus) I F O 1 3 8 6 7 由来の還元酵素遺伝子及びバシラス・メガテリウム (Bacillus megaterium) 由来のグルコース脱水素酵素遺伝子で形質転換された Escherichia coli HB101(pTSBG1) (受託番号: F E R M B P - 7 1 1 9、受託日: 平成 12 年 4 月 11 日)、

ロドコッカス・スピーシーズ (Rhodococcus sp.) K N K 0 1 由来の還元酵素遺伝子で形質転換された Escherichia coli HB101(pNTRS) (受託番号: F E R M B P - 0 8 5 4 5、受託日: 平成 15 年 1 月 10 日) 等が挙げられる。

これらの形質転換微生物は、それぞれ、日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 にある独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されており、これらの形質転換微生物のうち、Escherichia coli HB101(pNTCRG)、Escherichia coli HB101(pNTDRG1)、Escherichia coli HB101(pNTRGG1)、Escherichia coli HB101(pTSBG1)、及び、Escherichia coli HB101(pNTRS)は、ブダペスト条約に基づいて国際寄託されている。

なお、本発明の還元工程を、補酵素再生系と組み合わせて実施する、または、

酵素源として上記形質転換微生物の培養物もしくはその処理物を用いる場合は、補酵素として、より安価な酸化型のNAD (P) を添加して反応を行うことも可能である。

還元反応で生じた光学活性3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体(3)

5 は、常法により精製することが出来る。例えば、光学活性2-(ヒドロキシメチル)-3-フェニルプロピオン酸エチルは、酵素源として微生物等を用いた場合には、必要に応じ遠心分離、濾過等の処理を施して菌体等の懸濁物を除去し、次いで酢酸エチル、トルエン等の有機溶媒で抽出し、有機溶媒を減圧下に除去し、そして減圧蒸留またはクロマトグラフィー等の処理を行う事により、精製するこ
10 とができる。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を挙げ、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

15 (参考例1) 3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオン酸エチルエステルの調製

3,4-メチレンジオキシケイ皮酸50gをエタノール500mLに溶解させ、これに5%Pd/C触媒5gを加えた。反応系を水素ガス置換し、25°Cで6時間攪拌した。反応終了後、Pd/C触媒をろ過操作にて除去した。得られたエタノール溶液を5°Cに冷却し、塩化チオニル37.1gを一時間かけて滴下した。滴下終了後、内温5°Cでさらに3時間攪拌した。反応終了後、減圧下にて溶媒を留去し、橙色濃縮物54.7gを得た。これを一部抜き取り、高速液体カラムクロマトグラフィー(HPLC) (カラム: LiChrosphere 100 PR-8 (E) 250mm×4.0mm I. D. 、メルク社製、移動相: リン酸・リン酸二水素カリウム水溶液/アセトニトリル=1/1、流速: 1mL/分、検出波長: 210nm、カラム温度: 30°C) にて分析を行ったところ、表題化合物49.8gを含有していることを確認した。

¹H NMR (400Hz, CDCl₃) δ: 6.77-6.63 (3H, m), 5.93 (2H, s), 4.17-4.10 (2H, q), 2.86 (2H, t)

) , 2. 56 (2H, t) , 1. 27 (3H, t) 。

(参考例 2) 2-ホルミル-3-フェニルプロピオン酸エチルの製造法

60%NaH 4. 4 g を THF 200m1 に懸濁した溶液に、3-フェニルプロピオン酸エチル 17. 8 g 及び蟻酸エチル 8. 2 g を氷冷下、1 時間かけて適下した後、室温にて 15 時間攪拌した。さらに、60%NaH 14 g 及び蟻酸エチル 25. 9 g を 3 回に分割して添加した後、室温にて 15 時間攪拌した。得られた反応液に、10%クエン酸溶液を添加した後、酢酸エチルにて抽出し、減圧濃縮することにより茶色油状の濃縮物 32. 4 g を得た。得られた濃縮物をシリカゲルカラムにて精製することにより、表題化合物 17. 9 g を透明油状物として得た。

(参考例 3) 2-ホルミル-3-フェニルプロピオン酸メチルの製造法

3-フェニルプロピオン酸エチル及び蟻酸エチルの代わりに 3-フェニルプロピオン酸メチル及び蟻酸メチルを用いて、参考例 2 と同様の方法に従い、表題化合物を透明油状物として得た。

(参考例 4) 2-ホルミル-3-フェニルプロピオン酸イソプロピルの製造法

3-フェニルプロピオン酸エチル及び蟻酸エチルの代わりに 3-フェニルプロピオン酸イソプロピル及び蟻酸イソプロピルを用いて、参考例 2 と同様の方法に従い、表題化合物を透明油状物として得た。

(参考例 5) 2-ホルミル-3-フェニルプロピオン酸イソブチルの製造法

3-フェニルプロピオン酸エチル及び蟻酸エチルの代わりに 3-フェニルプロピオン酸イソブチル及び蟻酸イソブチルを用いて、参考例 2 と同様の方法に従い、表題化合物を透明油状物として得た。

(実施例 1) 2-ホルミル-3-(3, 4-メチレンジオキシフェニル)-1-プロピオン酸エチルの製造法

60%NaH 2.4 g をテトラヒドロフラン(THF) 500m1 に懸濁した。3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオン酸エチル 84.5 g (純度 93.7 重量%) を THF 100m1 に溶かし、先の懸濁液に室温で滴下した。40°C に昇温して 15 分攪拌した後、蟻酸エチル 131 g を 2.5 時間 5 かけて滴下した後、さらに 3 時間攪拌した。

溶媒を留去し、反応溶液を約半量まで濃縮した後、冰浴で冷却し、水 500m1 を内温が 10°C 以下を保つ速度で滴下した。水層をヘキサン 200m1 で二回洗浄した後に、濃塩酸で pH 4.5 に調節した。これをトルエン 500m1 で 3 回抽出し、減圧濃縮により表題化合物 82.8 g を得た。下記の条件にてガスク 10 ロマトグラフィー(GC) 法にて化学純度を分析したところ、化学純度 94.7 重量% であった。

GC 分析条件=カラム: TC-F F A P 1m × 0.25 mm I. D. (GL サイエンス社製)、キャリアーガス: He = 8 kPa、検出: FID、カラム温度: 150°C、検出時間: 2-ホルミル-3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオン酸エチル 4.0 分。

(実施例 2) 2-ホルミル-3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオン酸エチルの製造法

60%NaH 7.91 g を THF 12m1 に懸濁し、40°C に昇温した。3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオン酸エチル 11.0 g と蟻酸エチル 11.0 g を THF 77.0 m1 に溶解し、先の懸濁液に 5~14 時間掛けて滴下した。1 時間攪拌後、蟻酸エチル 3.7 g を 5 時間で添加し、更に 12 時間攪拌した。

得られた反応混合物にトルエン 250m1 を加えて減圧濃縮し、約 10 重量% のトルエン懸濁液とした後、これを 10°C 以下に冷却した水 55m1 に内温が維持できる速度で滴下した。有機層を廃棄後、水層をトルエン 180m1 で一回洗浄し、この水層を濃塩酸で pH 5~7 に調節した後に、トルエン 90m1 で 2 回抽出し、1 回水洗後、有機層を減圧濃縮して、表題化合物 11.2 g を得た。実施例 1 の方法に従い、化学純度を分析したところ、化学純度 98.8 重量% であ

った。

(実施例3) 2-ホルミル-3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオン酸メチルの製造法

5 60%NaH 1.38gをTHF 12m1に懸濁した。3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオン酸メチル 2.4gをTHF 12m1に溶かし、先の懸濁液に室温で滴下した。40°Cに昇温して15分攪拌した後、蟻酸メチル 3.46gを1時間かけて滴下した。さらに、60%NaH 0.7g及び蟻酸メチル 0.9gを4回に分割して添加した後、40°Cにて3時間攪拌した。

10 溶媒を留去し、反応溶液を約半量まで濃縮した後、冰浴で冷却し、水 40m1を内温が10°C以下を保つ速度で滴下した。水層をトルエン 50m1で二回洗浄した後に、濃塩酸でpH 4.5に調節した。これをトルエン 50m1で2回抽出し、減圧濃縮により表題化合物 2.63gを得た。実施例1の方法に従い、化学純度を分析したところ、化学純度 96.4 重量%であった。

15

(実施例4) 2-ホルミルヘキサン酸エチルの製造法

60%NaH 60gをTHF 600m1に懸濁し、ヘキサン酸エチル 72.1gを先の懸濁液に室温で滴下した。40°Cに昇温して15分攪拌した後、蟻酸エチル 185.2gを6時間かけて滴下した。さらに、60%NaH 30g及び蟻酸エチル 92.6gを4回に分割して添加した後、40°Cにて3時間攪拌した。

溶媒を留去し、反応溶液を約半量まで濃縮した後、冰浴で冷却し、水 40m1を内温が10°C以下を保つ速度で滴下した。水層をトルエン 400m1で二回洗浄した後に、濃塩酸でpH 4.5に調節した。これをトルエン 700m1で2回抽出し、減圧濃縮により表題化合物 76.8gを得た。下記の方法に従い、化学純度を分析したところ、化学純度 96.6 重量%であった。

GC分析条件=カラム: HP-5 30m×0.32mm I.D. (J&W S c i e n t i f i c 社製)、キャリアーガス: He = 125 kPa、検出: FID、カラム温度: 120°C、検出時間: 2-ホルミルヘキサン酸エチル 6.9分、2-ヒドロキシメチルヘキサン酸エチル 9.8分。

¹H NMR (400 Hz, CDCl₃) δ: 11.42 (0.6 H, d), 9.70 (0.4 H, d), 7.0 (0.6 H, d), 4.16–4.27 (2 H, m), 3.25 (0.4 H, m), 1.24–2.37 (9 H, m), 0.90 (3 H, t)。

5

(実施例 5) 2-ホルミルヘキサン酸エチルの製造法

60%NaH 6.2 g を THF 126 ml に懸濁し、40°Cに昇温した。ヘキサン酸エチル 5.6 g と蟻酸エチル 8.6 g を THF 250 ml に溶解し、先の懸濁液に 5~20 時間掛けて滴下した。3 時間攪拌後、蟻酸エチル 8.6 g を 5 時間で添 10 加し、更に 12 時間攪拌した。

得られた反応混合物にトルエン 1200 ml を加えて減圧濃縮し、約 10 重量 % のトルエン懸濁液とした後、これを 10°C 以下に冷却した水 280 ml に内温 が維持できる速度で滴下した。有機層を廃棄後、水層をトルエン 570 ml で一 15 回洗浄し、この水層を濃塩酸で pH 5~7 に調節した後に、酢酸エチル 280 ml で 2 回抽出し、1 回水洗後、有機層を減圧濃縮して、表題化合物 5.5 g を得た。 実施例 4 の方法に従い、化学純度を分析したところ、化学純度 97.2 重量% で あつた。

(実施例 6) 2-ホルミル酪酸エチルの製造法

20 ヘキサン酸エチルの代わりに酪酸エチルを用いて、実施例 4 と同様の方法に従 い、表題化合物を茶色油状物として得た。実施例 4 の方法に従い、化学純度を 分析したところ、化学純度 96.4 重量% であった。

¹H NMR (400 Hz, CDCl₃) δ: 11.42 (0.6 H, d), 9.70 (0.4 H, d), 7.0 (0.6 H, d), 4.15–4.28 (2 H, m), 3.17–3.21 (0.4 H, m), 1.23–2.29 (5 H, m), 0.96–1.05 (3 H, m)。

(実施例 7) 2-ホルミルヘプタン酸エチルの製造法

ヘキサン酸エチルの代わりにヘプタン酸エチルを用いて、実施例 4 と同様の方

法に従い、表題化合物を茶色油状物として得た。実施例4の方法に従い、化学純度を分析したところ、化学純度96.7重量%であった。

¹H NMR (400 Hz, CDCl₃) δ: 11.43 (0.6 H, d), 9.70 (0.4 H, d), 7.1 (0.6 H, d), 4.16-4.27 (2 H, m), 3.23-3.27 (0.4 H, m), 1.21-2.06 (11 H, m), 0.85-0.91 (3 H, m)。

(実施例8) 2-ホルミルオクタン酸エチルの製造法

ヘキサン酸エチルの代わりにオクタン酸エチルを用いて、実施例4と同様の方法に従い、表題化合物を茶色油状物として得た。実施例4の方法に従い、化学純度を分析したところ、化学純度95.4重量%であった。

¹H NMR (400 Hz, CDCl₃) δ: 11.43 (0.6 H, d), 9.70 (0.4 H, d), 7.0 (0.6 H, d), 4.16-4.27 (2 H, m), 3.23-3.27 (0.4 H, m), 1.25-1.88 (13 H, m), 0.88 (3 H, t)。

(比較例1) 2-ホルミル-3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)一プロピオン酸エチルの製造法

60%NaH 2.0 g を THF 30 mL に懸濁した。懸濁液を0°Cに冷却し、3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)一プロピオン酸エチル 6.0 g (純度92.1重量%) を THF 20 mL に溶かし、先の懸濁液に滴下した。0°Cで蟻酸エチル 4 mL を滴下した後、室温に戻しさらに20分攪拌した。反応溶液を40°Cに加熱し、さらに攪拌を続けた。加熱後、約30分でガス発生が認められた。ガス発生が終わった時点でHPLC (カラム: LiChrosphere 100 PR-8 (E) 250 mm × 4.0 mm I. D.、メルク社製、移動相: リン酸・リン酸二水素カリウム水溶液/アセトニトリル=1/1、流速: 1 mL/分、検出波長: 210 nm、カラム温度: 30°C) にて反応溶液を分析したところ、原料の残存が認められたため、さらにNaH 1 g、蟻酸エチル 4 mL を加え、40°Cで攪拌した。再びガス発生が始まり、15分程度で終了した。反

応液を再度分析したところ、まだ原料の残存が認められたため、再度NaH 1 g と蟻酸エチル 4 mL を加えた。ガス発生終了後、再度分析を行ったところ、わずかに原料の残存があり、さらにNaH 1 g および蟻酸エチル 8 mL を添加、原料の消失を確認したので、反応を停止した。塩酸でpH = 7 ~ 8 に調整後、酢酸エチルを加え抽出を行った。分液ロートにて、NaHに含まれるミネラルオイルを分液操作で除去し、得られた酢酸エチル層を濃縮することにより、オレンジ色のオイルとして表題化合物 4. 75 gを得た。実施例 1 の方法に従い、化学純度を分析したところ、化学純度 80. 20 重量% であった。

10 (実施例 9) 光学活性 2-(ヒドロキシメチル)-3-フェニルプロピオン酸エチルの製造法

グルコース 4%、イーストエキス 0. 3%、KH₂PO₄ 1. 3%、(NH₄)₂HPO₄ 0. 7%、NaCl 0. 01%、MgSO₄ · 7H₂O 0. 08%、ZnSO₄ · 7H₂O 0. 006%、FeSO₄ · 7H₂O 0. 009%、CuSO₄ · 5H₂O 0. 0005%、MnSO₄ · 4~5H₂O 0. 01%からなる液体培地 (pH 7. 0) を調製し、大型試験管に 5 mL づつ分注して、120°Cで 20 分間蒸気殺菌した。これらの液体培地に表 1 に示した微生物をそれぞれ 1 白金耳植菌し、30°Cで 2~3 日間振盪培養した。この培養液から遠心分離により菌体を集め、水洗後、0. 1 M リン酸緩衝液 (pH 6. 5) 1 mL に懸濁した。この菌体懸濁液 0. 5 mL と、2-ホルミル-3-フェニルプロピオン酸エチル 2 mg、グルコース 20 mg を含有する 0. 1 M リン酸緩衝液 0. 5 mL とを混合し、栓付試験管に入れ 30°Cで 24 時間振盪した。反応後、反応液を等量体積の酢酸エチルにより抽出し、抽出液中の基質及び生成物量をガスクロマトグラフィー (GC) 法により分析することにより、変換率 (%) を求めた。また、光学純度については、生成物を薄層クロマトグラフィー (TLC) にて精製した後、HPLC 法により分析した。その結果を表 1 に示す (変換率は 20~100%)。

分析条件、及び、変換率、光学純度の計算方法は以下の通りである。

GC 分析条件 = カラム : TC-F FFAP 5 m × 0. 25 mm I. D. (GLサ

イエンス社製)、キャリアーガス: $H_e = 30 \text{ kPa}$ 、検出: FID、カラム温度: 150°C 、検出時間: 2-ホルミル-3-フェニルプロピオン酸エチル 4.0分、2-ヒドロキシメチル-3-フェニルプロピオン酸エチル 12.0分。

HPLC分析条件=カラム: Chiralcel AS 250mm \times 4.6mm I. D. (ダイセル化学工業株式会社製)、溶離液: ヘキサン/イソプロパノール=98/2、流速: 1.0 ml/min 、検出: 210 nm 、カラム温度: 40°C 、検出時間: R体16.1分、S体18.3分。

変換率(%) = 生成物量 / (基質量 + 生成物量) $\times 100$

光学純度(%ee) = $(A - B) / (A + B) \times 100$ (A及びBは対応する鏡像異性体量を表わし、 $A > B$ である)。

表 1

	微生物	光学純度 %e. e.	立体配置
	<i>Brettanomyces anomalus</i>	86.8	(R)
5	<i>Candida cantarellii</i>	53.1	(R)
	<i>Candida glaebosa</i>	6.0	(R)
	<i>Candida gropengiesseri</i>	77.8	(R)
	<i>Candida lactis-condensi</i>	87.1	(R)
	<i>Candida magnoliae</i>	65.5	(R)
	<i>Candida maltosa</i>	70.3	(R)
	<i>Candida maris</i>	75.2	(R)
	<i>Candida mogii</i>	43.8	(R)
	<i>Candida pini</i>	53.1	(R)
	<i>Candida rugosa</i>	64.6	(R)
10	<i>Candida sorbophila</i>	90.1	(R)
	<i>Candida tropicalis</i>	78.5	(R)
	<i>Candida versatilis</i>	88.1	(R)
	<i>Cryptococcus curvatus</i>	17.6	(R)
	<i>Cryptococcus terreus</i>	37.3	(R)
	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	72.0	(R)
	<i>Debaryomyces robertsiae</i>	60.8	(R)
	<i>Galactomyces reessii</i>	72.2	(R)
15	<i>Ogataea minuta</i> var. <i>minuta</i>	78.1	(R)
	<i>Pichia canadensis</i>	68.7	(R)
	<i>Pichia canadensis</i>	77.4	(R)
	<i>Pichia silvicola</i>	37.4	(R)
	<i>Pichia xylosa</i>	43.9	(R)
	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	4.5	(R)
	<i>Rhodotorula graminis</i>	32.5	(R)
	<i>Rhodotorula lactosa</i>	16.5	(R)
20	<i>Saccharomyopsis selenospora</i>	54.8	(R)
	<i>Sporidiobolus johnsonii</i>	40.0	(R)
	<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	6.0	(R)
	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	4.8	(R)
	<i>Sterigmatomyces halophilus</i>	23.6	(R)
	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	90.6	(R)
	<i>Trichosporon asteroides</i>	47.7	(R)
	<i>Yamadazyma stipitis</i>	17.0	(R)
25	<i>Cystofilobasidium bisporidii</i>	24.8	(S)
	<i>Pichia bispola</i>	13.3	(S)
	<i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>glutinis</i>	43.7	(S)
	<i>Torulaspora globosa</i>	76.5	(S)
	<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>mrakii</i>	9.3	(S)
	<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>saturnus</i>	10.8	(S)
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	4.4	(S)

(実施例 10) 光学活性 2-(ヒドロキシメチル)-3-フェニルプロピオン酸エチルの製造法

表 2 に示す微生物について、グリセリン 1.5%、イーストエキス 0.5%、
 KH_2PO_4 1.3%、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.7%、 NaCl 0.01%、
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.08%、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.006%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.009%、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0005%、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 5\text{H}_2\text{O}$ 0.001%からなる液体培地 (pH 7.0) を用いて
 培養する以外は、実施例 9 と同様の方法に従い、変換率及び光学純度を測定した。
 その結果を表 2 に示す (変換率は 20 ~ 100%)。

10

表 2

微生物	光学純度 %e. e.	立体配置
<i>Achromobacter xylosoxidans subsp. denitrificans</i>	83.4	(R)
<i>Cellulomonas fimi</i>	63.6	(R)
<i>Cellulomonas sp.</i>	65.4	(R)
<i>Cellulomonas uda</i>	19.3	(R)
<i>Hafnia alvei</i>	85.6	(R)
<i>Jensenia canicruria</i>	74.2	(R)
<i>Klebsiella planticola</i>	80.1	(R)
<i>Proteus inconstans</i>	81.6	(R)
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	75.8	(R)
<i>Rhodococcus equi</i>	88.5	(R)
<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	25.5	(S)

20

(実施例 11) 光学活性 2-(ヒドロキシメチル)-3-フェニルプロピオン酸エチルの製造法

グルコース 4%、イーストエキス 0.3%、 KH_2PO_4 1.3%、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.7%、 NaCl 0.01%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.006%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.009%、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0005%、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0
 01%からなる液体培地 (pH 7.0) を調製し、大型試験管に 5 ml づつ分注
 して、120°Cで 20 分間蒸気殺菌した。これらの液体培地に表 3 に示した微生物
 をそれぞれ 1 白金耳植菌し、30°Cで 2 ~ 3 日間振盪培養した。この培養液か

ら遠心分離により菌体を集め、水洗し、氷冷アセトンを添加した後、減圧乾燥することにより、アセトン乾燥菌体を調製した。得られたアセトン乾燥菌体 5 m g、2-ホルミル-3-フェニルプロピオン酸エチル 2 m g、グルコース 10 m g、NAD (またはNADP) 1 m g、0. 1 M リン酸緩衝液 0. 5 m l (pH=6. 5) 及び酢酸エチル 0. 5 m l を栓付試験管に添加し、30°Cで24時間振盪した。次に、実施例9と同様の操作を行い、変換率及び光学純度を測定した。その結果を表3に示す。

表3

微生物	NAD		NADP	
	変換率 %	光学純度 % e.e.	変換率 %	光学純度 % e.e.
<i>Candida magnoliae</i> IFO 0705	<2	—	10.0	35.3
<i>Candida maris</i> IFO 10003	<2	—	4.1	97.4
<i>Candida sorbophila</i> IFO 1583	<2	—	44.2	31.8
<i>Candida tropicalis</i> IFO 1403	<2	—	18.0	38.5
<i>Candida versatilis</i> IFO 1228	<2	—	3.2	23.5
<i>Ogataea minuta</i> var. <i>minuta</i> IFO 0975	<2	—	52.6	99.1
<i>Pichia canadensis</i> IFO 0976	<2	—	53.6	98.0
<i>Pichia canadensis</i> IFO 0973	<2	—	72.3	96.4
<i>Pichia silvicola</i> IFO 0807	<2	—	11.6	83.1
<i>Saccharomyopsis selenospora</i> IFO 1850	<2	—	9.7	33.6
<i>Torulaspora globosa</i> IFO 0016	55.1	82.5	49.6	53.8

20 (実施例12) 光学活性2-ヒドロキシメチルアルカン酸エチルの製造法

実施例11で得られたアセトン乾燥菌体 5 m g、表4に示す各種2-ホルミルアルカン酸エチル 2 m g、グルコース 10 m g、NADP 1 m g、0. 1 M リン酸緩衝液 0. 5 m l (pH=6. 5) 及び酢酸エチル 0. 5 m l を栓付試験管に添加し、30°Cで24時間振盪した。反応後、反応液を等量体積の酢酸エチルにより抽出し、抽出液中の基質及び生成物量をガスクロマトグラフィー (GC) 法により分析することにより、変換率 (%) を求めた。また、光学純度については、生成物をHPLCラベル化剤 (3, 5-ジニトロ塩化ベンゾイル) を用いて誘導化し、TLCにて精製した後、HPLC法により分析した。その結果を表4に示す。分析条件は以下の通りである。

G C 分析条件=カラム: HP-5 30m×0.32mm I. D. (J & W S c i e n t i f i c 社製)、キャリアーガス: He=125kPa、検出: FID、カラム温度: 120°C、検出時間: 2-ホルミルヘキサン酸エチル 6.9分、2-ヒドロキシメチルヘキサン酸エチル 9.8分。

5 H P L C 分析条件=カラム: Chiralcel OD-H 0.46×25cm I. D. (ダイセル化学工業株式会社製)、溶離液: ヘキサン/イソプロパノール=95/5、流速: 0.5ml/min、検出: 210nm、カラム温度: 40°C、検出時間: (R)-2-ヒドロキシメチルヘキサン酸エチル誘導体 30.6分、(S)-2-ヒドロキシメチルヘキサン酸エチル誘導体 37.4分。

10

表 4

微生物	基質	変換率 %	光学純度 % e.e.
<i>Ogataea minuta</i> var. <i>minuta</i> IFO 0975	2-ホルミル酪酸エチル	90	88.7
	2-ホルミルヘキサン酸エチル	45	96.7
	2-ホルミルオクタン酸エチル	41	75.0
<i>Pichia Canadensis</i> IFO 0976	2-ホルミル酪酸エチル	63	37.5
	2-ホルミルヘキサン酸エチル	35	74.6
	2-ホルミルオクタン酸エチル	63	87.0
<i>Pichia Canadensis</i> IFO 0973	2-ホルミル酪酸エチル	89	48.1
	2-ホルミルヘキサン酸エチル	55	91.5
	2-ホルミルオクタン酸エチル	61	71.0

(実施例 13) 光学活性 2-(ヒドロキシメチル)-3-フェニルプロピオン酸エステルの製造法

組換え大腸菌HB101 (pNTCRG) 受託番号FERM BP-6898
25 を、500ml容坂口フラスコ中で滅菌した50mlの2×YT培地 (トリペプトン1.6%、イーストエキス1.0%、NaCl 0.5%、pH=7.0) に接種し、37°Cで18時間振とう培養した。得られた培養液1mlに表5に示す各種2-ホルミル-3-フェニルプロピオン酸エステル10mg、NADP 1mg、グルコース10mgを添加し、30°Cで2時間攪拌した。反応終了後、実

施例 9 と同様の分析法で、変換率及び光学純度を分析した。その結果を表 5 に示す（いずれも変換率は 100 % であった）。

表 5

基質	光学純度 立体配置	
	% e.e.	
R ₂ = Methyl	93	(R)
Ethyl	89	(R)
iso-Propyl	6	(S)
iso-Butyl	72	(R)

10

(実施例 14) 光学活性 2- (ヒドロキシメチル) -3- (3, 4-メチレンジオキシフェニル) -プロピオン酸エチルの製造法

表 6 に示す各種組み換え大腸菌を、500 ml 容坂口フラスコ中で滅菌した 50 ml の 2 × YT 培地（トリペプトン 1.6 %、イーストエキス 1.0 %、NaCl 0.5 %、pH = 7.0）に接種し、37 °C で 18 時間振とう培養した。得られた培養液 1 ml に 2-ホルミル-3- (3, 4-メチレンジオキシフェニル) -プロピオン酸エチル 10 mg、NAD（または NADP）1 mg、グルコース 10 mg を添加し、30 °C で 2 時間攪拌した。反応終了後、実施例 9 と同様の分析法で、変換率と生成物の光学純度を分析した。その結果を表 6 に示す（いずれも変換率は 100 % であった）。

表 6

微生物	光学純度 立体配置	
	% e.e.	%
<i>E. coli</i> HB101(pNTCRG)	95.7	(R)
<i>E. coli</i> HB101(pNTDRG1)	12.5	(R)
<i>E. coli</i> HB101(pNTRGG1)	78.3	(R)
<i>E. coli</i> HB101(pNTSGG1)	61.3	(R)
<i>E. coli</i> HB101(pTSBG1)	42.9	(S)

(実施例 15) 光学活性 2-ヒドロキシメチルアルカン酸エチルの製造法

表 7 に示す各種組み換え大腸菌を、500ml 容坂口フラスコ中で滅菌した 50ml の 2×YT 培地（トリペプトン 1.6%、イーストエキス 1.0%、NaCl 0.5%、pH=7.0）に接種し、37°C で 18 時間振とう培養した。

5 得られた培養液 1ml に、表 7 に示す各種 2-ホルミルアルカン酸エチル 1.0mg、NAD（または NADP）1mg、グルコース 1.0mg を添加し、30°C で 2 時間攪拌した。反応終了後、実施例 12 と同様の分析法で、変換率と生成物の光学純度を分析した。その結果を表 7 に示す（いずれも変換率は 100% であった）。

10

表 7

微生物	基質	変換率 %	光学純度 % e.e.	立体配置
<i>E. coli</i> HB101(pNTCRG) FERM BP-6898	2-ホルミル酪酸エチル	100	71.9	(S)
	2-ホルミルヘキサン酸エチル	100	15.4	(S)
	2-ホルミルオクタン酸エチル	100	59.2	(R)
<i>E. coli</i> HB101(pNTDRG1) FERM BP-08458	2-ホルミル酪酸エチル	100	94.2	(S)
	2-ホルミルヘキサン酸エチル	91	8.8	(R)
	2-ホルミルオクタン酸エチル	93	0.4	(S)
<i>E. coli</i> HB101(pNTRGG1) FERM BP-7858	2-ホルミル酪酸エチル	12.5	—	—
	2-ホルミルヘキサン酸エチル	30	94.6	(R)
	2-ホルミルオクタン酸エチル	99	65.4	(R)
<i>E. coli</i> HB101(pTSBG1) FERM BP-7119	2-ホルミル酪酸エチル	77	62.8	(R)
	2-ホルミルヘキサン酸エチル	63	77.0	(R)
	2-ホルミルオクタン酸エチル	52	41.9	(R)

(実施例 16) (R)-2-(ヒドロキシメチル)-3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオン酸エチルの製造法

組換え大腸菌 HB101 (pNTCRG) 受託番号 FERM BP-6898 を、500ml 容坂口フラスコ中で滅菌した 50ml の 2×YT 培地（トリペプトン 1.6%、イーストエキス 1.0%、NaCl 0.5%、pH=7.0）に接種し、37°C で 18 時間振とう培養した。得られた培養液 550ml に実施

例1で得られた2-ホルミル-3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)プロピオン酸エチル8.7g、NADP 27.5mg、グルコース8.9gを添加し、30°Cで24時間攪拌した。反応終了後、反応液からトルエンを用いて抽出、濃縮することにより、茶色油状物84.1gを得た。実施例9と同様の分析法で、生成物の化学純度と光学純度を分析したところ、化学純度96.5%、光学純度96.4%ee、(R)体であった。

¹H NMR (400Hz, CDCl₃) δ: 6.73-6.56 (3H, m), 5.93 (2H, s), 4.12-4.23 (2H, q), 3.76-3.64 (2H, m), 2.95-2.69 (3H, m), 1.27 (3H, t)。

10

(実施例17) (R)-2-(ヒドロキシメチル)-3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)プロピオン酸メチルの製造法

組換え大腸菌HB101 (pNTCRG) 受託番号FERM BP-6898を、500mL容坂口フラスコ中で滅菌した50mLの2×YT培地 (トリペプトン1.6%、イーストエキス1.0%、NaCl 0.5%、pH=7.0) に接種し、37°Cで18時間振とう培養した。得られた培養液50mLに実施例1で得られた2-ホルミル-3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)プロピオン酸メチル1.89g、NADP 2.5mg、グルコース1.9gを添加し、30°Cで24時間攪拌した。反応終了後、反応液からトルエンを用いて抽出、濃縮することにより、茶色油状物1.82gを得た。実施例9と同様の分析法で、生成物の化学純度及び光学純度を分析したところ、化学純度96.8%、光学純度98.0%ee、(R)体であった。

¹H NMR (400Hz, CDCl₃) δ: 6.73-6.62 (3H, m), 5.93 (2H, s), 3.77-3.67 (2H, m), 3.70 (3H, s), 2.96-2.90 (1H, m), 2.82-2.75 (2H, m)。

(実施例18) (S)-2-(ヒドロキシメチル)-3-(3,4-メチレンジオキシベンジル)プロピオン酸エチルの製造法

組換え大腸菌HB101 (pTSBG1) 受託番号FERM BP-7119

を、500m1容坂口フラスコ中で滅菌した50m1の2×YT培地（トリペプトン1.6%、イーストエキス1.0%、NaCl 0.5%、pH=7.0）に接種し、37℃で18時間振とう培養した。得られた培養液50m1に実施例1で得られた2-ホルミル-3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)プロピオノン酸エチル0.5g、NADP 2.5mg、グルコース0.5gを添加し、30℃で24時間攪拌した。反応終了後、反応液からトルエンを用いて抽出、濃縮することにより、茶色油状物0.49gを得た。実施例9と同様の分析法で、生成物の化学純度と光学純度を分析したところ、化学純度96.8%、光学純度43%e.e.、(S)体であった。

10 ¹H NMR (400Hz, CDCl₃) δ: 6.73-6.56 (3H, m), 5.93 (2H, s), 4.12-4.23 (2H, q), 3.76-3.64 (2H, m), 2.95-2.69 (3H, m), 1.27 (3H, t)。

(実施例19) (R)-2-ヒドロキシメチルヘキサン酸エチルの合成

15 組換え大腸菌HB101 (pNTRS) 受託番号FERM BP-08545を、500m1容坂口フラスコ中で滅菌した50m1の2×YT培地（トリペプトン1.6%、イーストエキス1.0%、NaCl 0.5%、硫酸亜鉛7水和物 50mg、pH=7.0）に接種し、30℃で40時間振とう培養した。得られた培養液25m1にグルコース脱水素酵素（天野エンザイム社製）1,000units、2-ホルミルヘキサン酸エチル2.5g、NAD 3mg、グルコース4g、硫酸亜鉛7水和物50mgを添加し、2.5Mの水酸化ナトリウム水溶液を滴下することによりpH 6.5に調整しながら、30℃で24時間攪拌した。反応終了後、反応液に酢酸エチル100m1を加えて抽出し、有機層を減圧下で留去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、油状の(R)-2-ヒドロキシメチルヘキサン酸エチルを得た。収率は90%、光学純度は93.6%e.e.であった。なお、光学純度の分析は、HPLCラベル化剤（3,5-ジニトロ塩化ベンゾイル）を用いて誘導化した後、Chiralcel OD-Hカラム 0.46×25cm I.D.（ダイセル化学工業社製）を用いたHPLC法によって行った。

1H NMR (400 Hz, CDCl₃) δ : 4.13-4.24 (2H, q), 3.72-3.79 (2H, m), 2.53-2.59 (1H, m), 1.5-1.7 (2H, m), 1.24-1.37 (7H, m), 0.9 (3H, t)。

5

(実施例 20) (R) - 2-ヒドロキシメチルヘプタン酸エチルの合成

2-ホルミルヘキサン酸エチルの代わりに2-ホルミルヘプタン酸エチルを用いて、実施例19と同様の方法に従い、表題化合物を透明油状物として得た。収率は90%、光学純度は87%eeであった。

10 1H NMR (400 Hz, CDCl₃) δ : 4.13-4.24 (2H, q), 3.69-3.79 (2H, m), 2.53-2.59 (1H, m), 1.44-1.69 (2H, m), 1.22-1.36 (9H, m), 0.9 (3H, t)。

15 産業上の利用可能性

本発明の方法により、医薬品中間体として有用な光学活性3-ヒドロキシプロピオニ酸エステル誘導体を安価な原料から簡便に製造することができる。

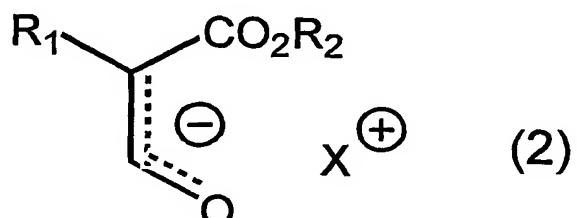
請求の範囲

1. 一般式 (1) ;



(式中、R₁は炭素数2～10のアルキル基、置換基を有していても良い炭素数5～15のアラルキル基、又は置換基を有していても良い炭素数5～15のアリール基を表す。R₂は炭素数1～10のアルキル基、又は置換基を有していても良い炭素数5～15のアラルキル基を表す。) で表される酢酸エステル誘導体を、

10 塩基及び蟻酸エステルと反応させることにより、一般式 (2) ;



(式中、R₁及びR₂は前記と同じ。XはH、Li、Na、またはKを表す。) で表される2-ホルミル酢酸エステル誘導体に変換する工程、及び、有機溶媒と水を用い、不純物を有機層に除去しつつ、前記式(2)で表される誘導体を水層に転溶する工程を含むことを特徴とする、前記式(2)で表される2-ホルミル酢酸エステル誘導体の製造法。

20 2. 前記式(1)及び(2)において、R₁が炭素数2～10のアルキル基又は置換基を有していても良い炭素数5～15のアラルキル基である請求の範囲第1項記載の製造法。

25

3. 前記式(1)及び(2)において、R₂が炭素数1～10のアルキル基である請求の範囲第1または2項記載の製造法。

4. 塩基が、ナトリウムハイドライド、金属ナトリウム、又はアルカリ金属ア

ルコキサイドである請求の範囲第1、2または3項記載の製造法。

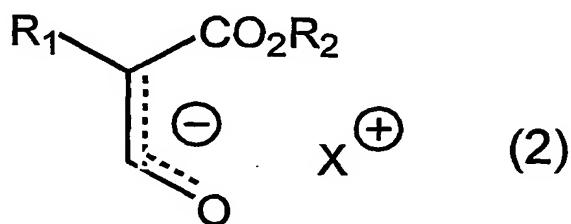
5. 反応を、塩基を含む溶媒に酢酸エステル誘導体および蟻酸エステルを添加して行う請求の範囲第1、2、3または4項記載の製造法。

5

6. 反応を塩基濃度が10重量%以上、および反応温度が20°C以上の条件で行う請求の範囲第5項記載の製造法。

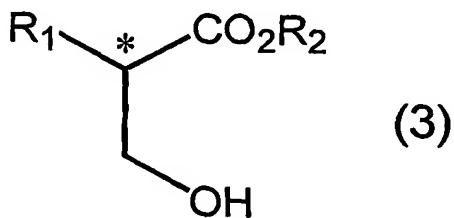
7. 一般式(2)；

10



15 (式中、R₁は炭素数2～10のアルキル基、置換基を有していても良い炭素数5～15のアラルキル基、又は置換基を有していても良い炭素数5～15のアリール基を表す。R₂は炭素数1～10のアルキル基、又は置換基を有していても良い炭素数5～15のアラルキル基を表す。XはH、Li、Na、またはKを表す。)で表される2-ホルミル酢酸エステル誘導体に、そのホルミル基を立体選択的に還元する能力を有する酵素源を作用させることにより、一般式(3)；

20



25

(式中、R₁及びR₂は前記と同じ。*は不斉炭素原子を表す。)で表される光学活性3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体を製造する方法であって、ブレタノマイセス (Brettanomyces) 属、クリプトコッカス (Cryptococcus) 属、デバリオマイセス (Debaryomyces) 属、ガラクトマイセス (Galactomyces) 属、

オガタエア (Ogataea) 属、ピキア (Pichia) 属、サッカロマイコプシス (Saccharomyces) 属、スボリディオボラス (Sporidiobolus) 属、スボロボロマイセス (Sporobolomyces) 属、ステリグマトマイセス (Sterigmatomyces) 属、トルラスピラ (Torulaspora) 属、トリコスボロン (Trichosporon) 属、ヤマダジーマ (Yamadazyma) 属、アクロモバクター (Achromobacter) 属、セルロモナス (Cellulomonas) 属、デボシア (Devosia) 属、ハフニア (Hafnia) 属、ジェンセニア (Jensenia) 属、クレブシエラ (Klebsiella) 属、ミクロコッカス (Micrococcus) 属、プロテウス (Proteus) 属、ロドコッカス (Rhodococcus) 属またはセラチア (Serratia) 属に属する微生物に由来し、前記式 (2) で表される誘導体のホルミル基を R 選択的に還元する能力を有する酵素源を用いて、前記式 (3) で表される誘導体の R 体を製造するか、

又は、シストフィロバシディウム (Cystofilobasidium) 属、ピキア (Pichia) 属、ロドトルラ (Rhodotorula) 属、トルラスピラ (Torulaspora) 属、ウィリオプシス (Williopsis) 属、ヤロビア (Yarrowia) 属、デボシア (Devosia) 属、ミクロバクテリウム (Microbacterium) 属、又はミクロコッカス (Micrococcus) 属に属する微生物に由来し、前記式 (2) で表される誘導体のホルミル基を S 選択的に還元する能力を有する酵素源を用いて、前記式 (3) で表される誘導体の S 体を製造することを特徴とする製造法。

20 8. 前記式 (2) 及び (3) において、R₁が炭素数 2 ~ 10 のアルキル基又は置換基を有していても良い炭素数 5 ~ 15 のアラルキル基である請求の範囲第 7 項記載の製造法。

9. R 選択的な酵素源として、ブレタノマイセス・アノマラス (Brettanomyces anomalus) 、クリプトコッカス・クルバタス (Cryptococcus curvatus) 、クリプトコッカス・テレウス (Cryptococcus terreus) 、デバリオマイセス・ネパレンシス (Debaryomyces nepalensis) 、デバリオマイセス・ロベルトシエ (Debaryomyces robertsiae) 、ガラクトマイセス・レースシイ (Galactomyces reessii) 、オガタエア・ミヌータ バー・ミヌータ (Ogataea minuta var. minuta) 、ピキア

・カナデンシス (Pichia canadensis) 、ピキア・シルビコラ (Pichia silvicola) 、
ピキア・キシローサ (Pichia xylosa) 、サッカロマイコプシス・セレノスpora (Saccharomyopsis selenospora) 、スボリディオボラス・ジョンソニイ (Sporidiobolus johnsonii) 、スボリディオボラス・サルモニコラ (Sporidiobolus salmonicolor)
5 、スボロボロマイセス・サルモニコラ (Sporobolomyces salmonicolor) 、ス
テリグマトマイセス・ハロフィラス (Sterigmatomyces halophilus) 、トルラスボ
ラ・デルブルエッキイ (Torulaspora delbrueckii) 、トリコスボロン・アステロイデ
ス (Trichosporon asteroides) 、ヤマダジーマ・スチピチス (Yamadazyma stipitis)
10) 、アクロモバクター・キシロキダンス サブスピーシーズ デニトリフィカン
ス (Achromobacter xylosoxidans subsp. denitrificans) 、セルロモナス・フィミ (Cellulomonas fimi) 、セルロモナス・スピーシーズ (Cellulomonas sp.) 、セル
ロモナス・ウダ (Cellulomonas uda) 、デボシア・リボフラビナ (Devosia riboflavin) 、ハフニア・アルベイ (Hafnia alvei) 、ジェンセニア・カニクルリア (Jensenia canicruria) 、クレブシエラ・プランチコラ (Klebsiella planticola) 、ミ
15 クロコッカス・ルテウス (Micrococcus luteus) 、プロテウス・インコンスタン
ス (Proteus inconstans) 、ロドコッカス・エリスロポリス (Rhodococcus erythrophilus) 、ロドコッカス・エクイ (Rhodococcus equi) 、ロドコッカス・スピーシ
ーズ (Rhodococcus sp.) 、及びセラチア・マルセッセンス (Serratia marcescens)
20) からなる群より選択される微生物由来の酵素源を用い、前記式 (3) で表され
る誘導体のR体を製造する請求の範囲第7又は8項記載の製造法。

10. R選択的な酵素源が、Escherichia coli HB101(pNTDRG1) (FERM BP-0
8458) 、Escherichia coli HB101(pNTSGG1) (FERM P-18449) 、Escherichia coli
25 HB101(pTSBG1) (FERM BP-7119) 又は Escherichia coli HB101(pNTRS) (FER
M BP-08545) の培養物又はその処理物である請求の範囲第7、8または9項記
載の製造法。

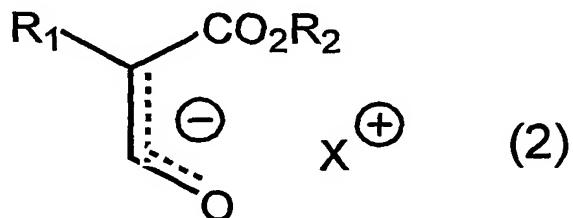
11. S選択的な酵素源として、シストフィロバシディウム・ビスピリディ (Cystofilobasidium bisporidii) 、ピキア・ビスボーラ (Pichia bispora) 、ロドト

ルラ・グルチニス バー、グルチニス (Rhodotorula glutinis var. glutinis)、トルラスピラ・グロボーサ (Torulaspora globosa)、ウィリオプシス・サツルヌス バー、マラキイ (Williopsis saturnus var. mrakii)、ウィリオプシス・サツルヌス バー、サツルヌス (Williopsis saturnus var. saturnus)、ヤロビア
5 リポリティカ (Yarrowia lipolytica)、デボシア・リボフラビナ (Devosia riboflavina)、ミクロバクテリウム・エステラロマチカム (Microbacterium esteraromaticum)、及びミクロコッカス・ルテウス (Micrococcus luteus) からなる群より選択される微生物由来の酵素源を用い、前記式 (3) で表される誘導体の S 体を
製造する請求の範囲第 7 又は 8 項記載の製造法。

10

12. S 選択的な酵素源が、Escherichia coli HB101(pNTDRG1) (FERM BP-0 8458)、又は Escherichia coli HB101(pTSBG1) (FERM BP-7119) の培養物又はその処理物である請求の範囲第 7、8 または 11 項記載の製造方法。

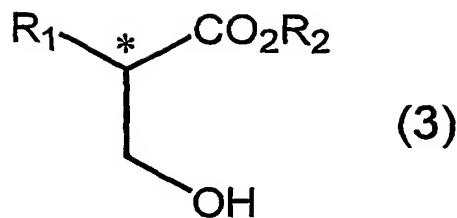
15 13. 一般式 (2) ;



20

(式中、R₁は炭素数 2～10 のアルキル基、置換基を有していても良い炭素数 5～15 のアラルキル基、又は置換基を有していても良い炭素数 5～15 のアリール基を表す。R₂は炭素数 1～10 のアルキル基、又は置換基を有していても良い炭素数 5～15 のアラルキル基を表す。XはH、Li、Na、又はKを表す。

25) で表される 2-ホルミル酢酸エステル誘導体に、そのホルミル基を立体選択的に還元する能力を有する酵素源を作用させることにより、一般式 (3) ;



5

(式中、R₁及びR₂は前記と同じ。*は不斉炭素原子を表す。)で表される光学活性3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体を製造する方法であって、
 キャンディダ・カンタレリ (Candida cantarellii)、キャンディダ・グラエボーサ
 (Candida glaebosa)、キャンディダ・グロベンギッセリイ (Candida gropengies
 seri)、キャンディダ・ラクチス-コンデンシイ (Candida lactis-condensi)、キ
 ャンディダ・マグノリエ (Candida magnoriae)、キャンディダ・マルトーサ (C
 andida maltosa)、キャンディダ・マリス (Candida maris)、キャンディダ・モ
 ギイ (Candida mogii)、キャンディダ・ピニ (Candida pini)、キャンディダ・
 ルゴーサ (Candida rugosa)、キャンディダ・ソルボフィラ (Candida sorbophila
)、キャンディダ・トロピカリス (Candida tropicalis)、キャンディダ・バーサ
 チリス (Candida versatilis)、ロドトルラ・アウランチアカ (Rhodotorula auranti
 aca)、ロドトルラ・グルチニス (Rhodotorula glutinis)、ロドトルラ・グラミニ
 ス (Rhodotorula graminis)、及びロドトルラ・ラクトーサ (Rhodotorula lactosa
)からなる群より選択される微生物に由来し、前記式(2)で表される誘導体の
 20 ホルミル基をR選択的に還元する能力を有する酵素源を用いて、前記式(3)で
 表される誘導体のR体を製造するか、
 又は、キャンディダ・マグノリエ (Candida magnoriae)に由来し、前記式(2)
 25)で表される誘導体のホルミル基をS選択的に還元する能力を有する酵素源を用
 いて、前記式(3)で表される誘導体のS体を製造することを特徴とする製造法。

25

14. R選択的な酵素源が、Escherichia coli HB101(pNTCRG) (FERM BP-68
 98) 又は Escherichia coli HB101(pNTRGG1) (FERM BP-7858) の培養物又はそ
 の処理物である請求の範囲第13項記載の製造法。

15. S選択的な酵素源が、Escherichia coli HB101(pNTCRG) (FERM BP-6898) の培養物又はその処理物である請求の範囲第13項記載の製造法。

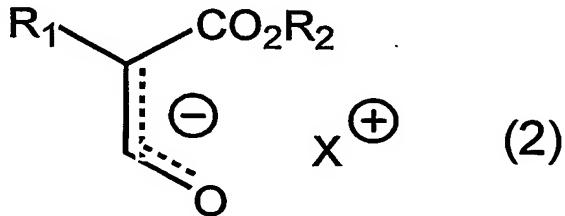
16. 前記式(2)及び(3)において、R₁がn-ブチル基又は3, 4-メチレンジオキシベンジル基である請求の範囲第13項記載の製造法。

17. 一般式(1)；



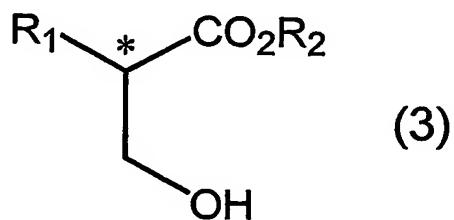
10 (式中、R₁は炭素数2～10のアルキル基、置換基を有していても良い炭素数5～15のアラルキル基、又は置換基を有していても良い炭素数5～15のアリール基を表す。R₂は炭素数1～10のアルキル基、又は置換基を有していても良い炭素数5～15のアラルキル基を表す。)で表される酢酸エステル誘導体を、塩基及び蟻酸エ斯特ルと反応させることにより、一般式(2)；

15



20 (式中、R₁及びR₂は前記と同じ。XはH、Li、Na、又はKを表す。)で表される2-ホルミル酢酸エ斯特ル誘導体に変換する工程、有機溶媒と水を用い、不純物を有機層に除去しつつ、前記式(2)で表される誘導体を水層に転溶する工程、及び前記式(2)で表される誘導体のホルミル基を立体選択的に還元する能力を有する酵素源を用いて、前記式(2)で表される誘導体を立体選択的に還元することにより、一般式(3)；

25



(式中、R₁及びR₂は前記と同じ。*は不斉炭素原子を表す。)で表される光学活性3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体を取得する工程を含むことを特徴とする、前記式(3)で表される光学活性3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体の製造法。

5

18. 前記式(1)、(2)及び(3)において、R₁が炭素数2～10のアルキル基又は置換基を有していても良い炭素数5～15のアラルキル基である請求の範囲第17項記載の製造法。

10 19. 前記式(1)、(2)及び(3)において、R₂が炭素数1～10のアルキル基である請求の範囲第17または18項記載の製造法。

20. 前記式(2)で表される誘導体のホルミル基を立体選択的に還元する能力を有する酵素源が、ブレタノマイセス(Brettanomyces)属、キャンディダ(Candida)属、クリプトコッカス(Cryptococcus)属、デバリオマイセス(Debaryomyces)属、ガラクトマイセス(Galactomyces)属、オガタエア(Ogataea)属、ピキア(Pichia)属、ロドトルラ(Rhodotorula)属、サッカロマイコプシス(Saccharomyopsis)属、スボリディオボラス(Sporidiobolus)属、スボロボロマイセス(Sporobolomyces)属、ステリグマトマイセス(Sterigmatomyces)属、トルラスボラ(Torulaspora)属、トリコスボロン(Trichosporon)属、ヤマダジーマ(Yamadazyma)属、アクロモバクター(Achromobacter)属、セルロモナス(Cellulomonas)属、デボシア(Devosia)属、ハフニア(Hafnia)属、ジェンセニア(Jensenia)属、クレブシエラ(Klebsiella)属、プロテウス(Proteus)属、ロドコッカス(Rhodococcus)属、セラチア(Serratia)属、シストフィロバシディウム(Cystofilobasidium)属、ウイリオプシス(Williopsis)属、ヤロビア(Yarrowia)属、ミクロバクテリウム(Microbacterium)属、又はミクロコッカス(Micrococcus)属に属する微生物に由来する酵素源である請求の範囲第17、18又は19項記載の製造法。

21. 酵素源として、ブレタノマイセス (Brettanomyces) 属、キャンディダ (Candida) 属、クリプトコッカス (Cryptococcus) 属、デバリオマイセス (Debaryomyces) 属、ガラクトマイセス (Galactomyces) 属、オガタエア (Ogataea) 属、ピキア (Pichia) 属、ロドトルラ (Rhodotorula) 属、サッカロマイコプシス (Saccharomyces) 属、スボリディオボラス (Sporidiobolus) 属、スボロボロマイセス (Sporobolomyces) 属、ステリグマトマイセス (Sterigmatomyces) 属、トルラスボラ (Torulaspora) 属、トリコスボロン (Trichosporon) 属、ヤマダジーマ (Yamadazyma) 属、アクロモバクター (Achromobacter) 属、セルロモナス (Cellulomonas) 属、デボシア (Devosia) 属、ハフニア (Hafnia) 属、ジェンセニア (Jensenia) 属、クレブシエラ (Klebsiella) 属、ミクロコッカス (Micrococcus) 属、プロテウス (Proteus) 属、ロドコッカス (Rhodococcus) 属、又はセラチア (Serratia) 属に属する微生物に由来し、前記式(2)で表される誘導体のホルミル基をR選択的に還元する能力を有する酵素源を用い、前記式(3)で表される誘導体のR体を製造する請求の範囲第20項記載の製造法。

15

22. R選択的に還元する能力を有する酵素源が、ブレタノマイセス・アノマラス (Brettanomyces anomalus)、キャンディダ・カンタレリ (Candida cantarellii)、キャンディダ・グラエボーサ (Candida glaebosa)、キャンディダ・グロペンギッセリイ (Candida gropengiesseri)、キャンディダ・ラクチスコンデンシイ (Candida lactis-condensi)、キャンディダ・マグノリエ (Candida magnoriae)、キャンディダ・マルトーサ (Candida maltosa)、キャンディダ・マリス (Candida maris)、キャンディダ・モギイ (Candida mogii)、キャンディダ・ピニ (Candida pini)、キャンディダ・ルゴーサ (Candida rugosa)、キャンディダ・ソルボフィラ (Candida sorbophila)、キャンディダ・トロピカリス (Candida tropicalis)、キャンディダ・バーサチリス (Candida versatilis)、クリプトコッカス・クルバタス (Cryptococcus curvatus)、クリプトコッカス・テレウス (Cryptococcus terreus)、デバリオマイセス・ネパレンシス (Debaryomyces nepalensis)、デバリオマイセス・ロベルトシエ (Debaryomyces robertsiae)、ガラクトマイセス・レースシイ (Galactomyces reessii)、オガタエア・ミヌータ バー、ミ

ヌータ (*Ogataea minuta* var. *minuta*) 、ピキア・カナデンシス (*Pichia canadensis*) 、ピキア・シルビコラ (*Pichia silvicola*) 、ピキア・キシローサ (*Pichia xylosoa*) 、ロドトルラ・アウランチアカ (*Rhodotorula aurantiaca*) 、ロドトルラ・グルチニス (*Rhodotorula glutinis*) 、ロドトルラ・グラミニス (*Rhodotorula graminis*) 、ロドトルラ・ラクトーサ (*Rhodotorula lactosa*) 、サッカロマイコプシス・セレノスボラ (*Saccharomyopsis selenospora*) 、スボリディオボラス・ジョンソンニイ (*Sporidiobolus johnsonii*) 、スボリディオボラス・サルモニコラ (*Sporidiobolus salmonicolor*) 、スボロボロマイセス・サルモニコラ (*Sporobolomyces salmonicolor*) 、ステリグマトマイセス・ハロフィラス (*Sterigmatomyces halophilus*) 、トルラスピラ・デルプレッキイ (*Torulaspora delbrueckii*) 、トリコスボロン・アステロイデス (*Trichosporon asteroides*) 、ヤマダジーマ・スチピチス (*Yamadazyma stipitis*) 、アクロモバクター・キシロキダンス サブスピーシーズ デニトリフィカンス (*Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans*) 、セルロモナス・フィミ (*Cellulomonas fimi*) 、セルロモナス・スピーシーズ (*Cellulomonas* sp.) 、セルロモナス・ウダ (*Cellulomonas uda*) 、デボシア・リボフラビナ (*Devosia riboflava*) 、ハフニア・アルベイ (*Hafnia alvei*) 、ジェンセニア・カニクルリア (*Jensenia canicruria*) 、クレプシエラ・プランチコラ (*Klebsiella planticola*) 、ミクロコッカス・ルテウス (*Micrococcus luteus*) 、プロテウス・インコンスタンス (*Proteus inconstans*) 、ロドコッカス・エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*) 、ロドコッカス・エクイ (*Rhodococcus equi*) 、ロドコッカス・スピーシーズ (*Rhodococcus* sp.) 、及びセラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*) からなる群より選択される微生物由来の酵素源である請求の範囲第21項記載の製造法。

25 23. R選択的に還元する能力を有する酵素源が、*Escherichia coli* HB101(pNTCRG) (FERM BP-6898) 、*Escherichia coli* HB101(pNTDRG1) (FERM BP-08458) 、*Escherichia coli* HB101(pNTRGG1) (FERM BP-7858) 、*Escherichia coli* HB101(pNTSGG1) (FERM P-18449) 、*Escherichia coli* HB101(pTSBG1) (FERM BP-7119) 、又は*Escherichia coli* HB101(pNTRS) (FERM BP-08545) の培養物

又はその処理物である請求の範囲第 2 2 項記載の製造法。

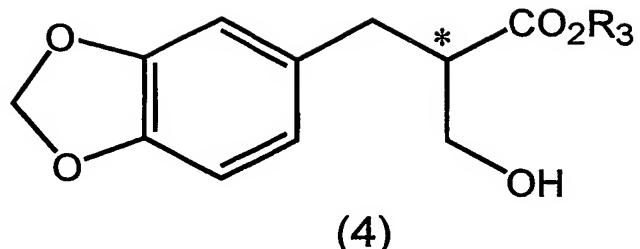
2 4. 酵素源として、キャンディダ (Candida) 属、シストフィロバシディウム (Cystofilobasidium) 属、ピキア (Pichia) 属、ロドトルラ (Rhodotorula) 属、
5 トルラスボラ (Torulaspora) 属、ウィリオプシス (Williopsis) 属、ヤロビア (Yarrowia) 属、デボシア (Devosia) 属、ミクロバクテリウム (Microbacterium) 属、
又はミクロコッカス (Micrococcus) 属に属する微生物に由来し、前記式 (2) で表される誘導体のホルミル基を S 選択的に還元する能力を有する酵素源を用い、
前記式 (3) で表される誘導体の S 体を製造する請求の範囲第 2 0 項記載の製造
10 法。

2 5. 前記式 (2) で表される誘導体のホルミル基を S 選択的に還元する能力を有する酵素源が、キャンディダ・マグノリエ (Candida magnoliae)、シストフィロバシディウム・ビスポリディ (Cystofilobasidium bisporidii)、ピキア・ビスボーラ (Pichia bispora)、ロドトルラ・グルチニス バー。グルチニス (Rhodotorula glutinis var. glutinis)、トルラスボラ・グロボーサ (Torulaspora glo bosa)、ウィリオプシス・サツルヌス バー。マラキイ (Williopsis saturnus var. mrankii)、ウィリオプシス・サツルヌス バー。サツルヌス (Williopsis saturnus var. saturnus)、ヤロビア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica)、デボシア・リボフラビナ (Devosia riboflavina)、ミクロバクテリウム・エステラロマチカム (Microbacterium esteraromaticum)、及びミクロコッカス・ルテウス (Micrococcus luteus) からなる群より選択される微生物由来の酵素源である請求の範囲第 2 4 項記載の製造方法。

2 6. 前記式 (2) で表される誘導体のホルミル基を S 選択的に還元する能力を有する酵素源が、Escherichia coli HB101(pNTCRG) (FERM BP-6898)、Escherichia coli HB101(pNTDRG1) (FERM BP-08458)、又は Escherichia coli HB101(pTSBG1) (FERM BP-7119) の培養物またはその処理物である請求の範囲第 2 4 または 2 5 項記載の製造法。

27. 一般式 (4) ;

5



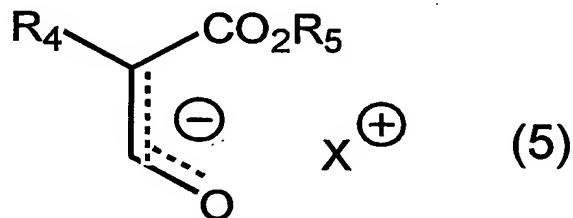
(4)

(式中、R₃は炭素数1～10のアルキル基を表し、*は不斉炭素原子を表す。)

10 ()で表される光学活性2-(ヒドロキシメチル)-3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオン酸エステル誘導体。

28. 一般式 (5) ;

15



(5)

20 (式中、R₄は炭素数2～6のアルキル基を表す。R₅は炭素数1～10のアルキル基を表す。XはH、Li、Na、又はKを表す。)で表される2-ホルミル酢酸エステル誘導体。29. 一般式 (5)において、R₅がエチル基である請求の範囲第28項記載の2-ホルミル酢酸エステル誘導体。25 30. 一般式 (5)において、R₄がエチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、又はヘキシル基である請求の範囲第28または29項記載の2-ホルミル酢酸エステル誘導体。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15644

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07C67/36, 69/716, C07D317/60, C12P41/00//C07M7:00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07C67/36, 69/716, C07D317/60

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0212859 A2 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC.), 04 March, 1987 (04.03.87), Claims; pages 21, 25; example 1 & GB 2179346 A & AU 8661099 A & JP 62-48649 A & BR 8603992 A & DK 8603945 A & ZA 8605792 A & HU 41597 T & PT 83233 A & US 4802913 A & ES 2001880 A & US 4913721 A & DE 3674114 G & CA 1280417 C & US 5124353 A & US 5229393 A	1-6

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Date of the actual completion of the international search
24 March, 2004 (24.03.04)Date of mailing of the international search report
13 April, 2004 (13.04.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15644

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Claims 1-6 (the part corresponding to the invention (I) given in the extra sheet)

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15644

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet(1)

Claims 1-30 involve the following four inventions:

(I) a process for producing a 2-formylacetic ester derivative represented by the general formula (2) from an acetic ester derivative represented by the general formula (1);

(II) a process for producing an optically active 3-hydroxypropionic ester derivative represented by the general formula (3) from a 2-formylacetic ester derivative represented by the general formula (2);

(III) an optically active 2-(hydroxy)-3-(3,4-methylenedioxyphenyl)propionic ester derivative represented by the general formula (4); and

(IV) a 2-formylacetic ester derivative represented by the general formula (5).

A matter common to these four inventions is the basic skeleton formed by removing the variable parts from a 2-formylacetic ester derivative represented by the general formula (2).

However, the basic skeleton is not novel as apparent from the fact that it is disclosed in JP 60-199389 A (F. Hoffmann-La Roche und Co. AG.), 08 October, 1985 (08.10.85).

Therefore, the matter common to these four inventions is not regarded as a special technical feature. These four inventions are hence not considered to be so linked as to form a single general inventive concept.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl. 1' C07C67/36, 69/716, C07D317/60, C12P41/00 // C07M7:00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl. 1' C07C67/36, 69/716, C07D317/60

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP 0212859 A2 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC) 1987. 03. 04 特許請求の範囲, 第21頁, 第25頁実施例1 & GB 2179346 A & AU 8661099 A & JP 62-48649 A & BR 8603992 A & DK 8603945 A & ZA 8605792 A & HU 41597 T & PT 83233 A & US 4802913 A & ES 2001880 A & US 4913721 A & DE 3674114 G & CA 1280417 C & US 5124353 A & US 5229393 A	1-6

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 03. 2004

国際調査報告の発送日

13. 4. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

爾見 武志

4 H 9547

電話番号 03-3581-1101 内線 3443

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT第17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

特別ページを参照。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-6 (特別ページに記載した(I)の発明に対応する部分)

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第1ページ第II欄の続き

請求の範囲1-30には、

- (I) 一般式(1)で表される酢酸エステル誘導体から、一般式(2)で表される2-ホルミル酢酸エステル誘導体を製造する方法
- (II) 一般式(2)で表される2-ホルミル酢酸エステル誘導体から、一般式(3)で表される光学活性3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体を製造する方法
- (III) 一般式(4)で表される光学活性2-(ヒドロキシ)-3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオン酸エステル誘導体
- (IV) 一般式(5)で表される2-ホルミル酢酸エステル誘導体

の4発明が記載されている。

そして、これら4発明に共通する事項は、一般式(2)で表される2-ホルミル酢酸エステル誘導体の、可変部位を除いた基本骨格である。

ところが、上記基本骨格は、JP 60-199389 A (エフ. ホフマンーラ ロシュ ウント コンパニー アクチエンゲゼルシャフト) 1985.10.08 に記載されているように、新規ではない。

よって、これら4発明に共通する事項は、特別な技術的特徴でないから、これら4発明は、单一の一般的発明概念を形成するように連関しているとはいえない。